

題目 熱変性脱灰骨基質ゼラチン、熱変性脱灰歯、および架橋コラーゲンの筋肉内移植後に認められた石灰化の組織学的比較

著者 二宮 雅美

内容要旨




脱灰骨基質ゼラチン(BMG)の筋肉内移植後に骨組織形成に先行してBMG内に生じる石灰化は、石灰化部位にアルカリフォスファターゼ活性がみられないこと、および形成の際に骨形成細胞や基質小胞が観察されないことから、Acellular Mineral Deposition (AMD)と呼ばれている。しかし、AMDにはその形成機構を含め多くの不明な点が残されている。そこで本研究では、BMPを含む非コラーゲン性蛋白とAMDとの関連を解明すべく、BMG内の非コラーゲン性蛋白を熱処理により失活させた熱変性BMGを筋肉内に移植し、石灰化物の形成過程を組織学的に観察した。さらに、象牙質での石灰化や架橋コラーゲンとAMDとの関連を考察すべく、熱変性脱灰歯、およびグルタルアルデヒドで人工的に架橋したコラーゲンをそれぞれ同様に移植し、移植後の石灰化物の形成過程を組織学的に比較した。

熱変性BMGは、Uristらの方法で作られたBMGに150℃で30分の熱処理を2回施して作製した。熱変性脱灰歯はラットの未萌出下顎第一臼歯を脱灰し、BMGと同じ熱処理を施して作製した。架橋コラーゲンでは、Nimniらの方法に従い、牛皮膚type Iコラーゲンを0.15M NaCl含有0.2%グルタルアルデヒド-0.05Mリン酸緩衝液で2週間架橋して作製した。この後、これらを5週齢S.D.系ラットの両側腹直筋内に移植し、1, 3, 5, 7, 10, 14日目に摘出して、左側を光顕用、右側を電顕用にそれぞれ組織学的処置を施し、光学顕微鏡、および透過型ないし走査型電子顕微鏡を用いて石灰化物の組織構造を観察した。各々生じた石灰化物の成分分析にはエレクトロンプローブX線微小分析を用いた。

その結果、熱変性BMGでは、3日目に出現したAMD様の球状石灰化物がBMG片の辺縁部から中央部に向かって経時的に数や大きさを増し、相互に融合しながら移植体全体を占めていった。熱変性脱灰歯でも同様の所見が得られたが、石灰化物は象牙質のエナメル質側から歯髄側に向かって一方向性に数や大きさを増していった。架橋コラーゲンでは、コラーゲン線維束の形状に沿った石灰化物がやはり3日目に出現し、次第に周囲のコラーゲン線維を侵し、移植体の辺縁部から中央部に向かって移植体全体を占めていくのが観察された。軟骨組織や骨組織の形成はどの移植体でもみられず、破骨細胞様多核巨細胞による移植体の吸収やこれらの細胞の出現も認められなかった。石灰化物はいずれも微細な針状結晶の凝集体で、結晶の大きさに多少の差が認められたものの、成分分析ではいずれの石灰化物でも同様のカルシウム/リンのモル比を示し、またアパタイトの前駆体が次第に相変化していることも示唆された。

本研究の結果から、AMDはBMGの移植後に骨組織形成に先行した形で生じるだけでなく、熱変性BMG、熱変性脱灰歯、あるいは架橋コラーゲンの移植後にも生じることが明らかとなるとともに、AMDはBMPを含む非コラーゲン性蛋白とは無関係で、むしろ移植体の基質の架橋コラーゲンに依存して物理化学的に生じている可能性が示唆された。また、熱変性脱灰歯でのAMDと象牙質の石灰化時に生じる象牙小球との形態的類似性より推測すると、AMDが生体内での石灰化現象に何らかの形で関わっている可能性も考えられた。

論文審査の結果の要旨

報告番号	① 乙	歯第 102 号	氏名	二宮雅美
審査委員	主査 永田 俊彦			
	副査 北村清一郎			
	副査 林 良夫			

題 目

熱変性脱灰骨基質ゼラチン，熱変性脱灰歯，および架橋コラーゲンの筋肉内移植後に認められた石灰化の組織学的比較

要 旨

脱灰骨基質ゼラチン(BMG)の筋肉内移植後に骨組織形成に先行してBMG内に生じる石灰化は、Acellular Mineral Deposition (AMD)と呼ばれている。しかし、AMDにはその形成機構を含め多くの不明な点が残されている。本研究では、非コラーゲン性蛋白とAMDとの関連を解明すべく、BMG内の非コラーゲン性蛋白を熱処理により失活させた熱変性BMGを筋肉内に移植し、石灰化物の形成過程を組織学的に観察するとともに、熱変性脱灰歯、およびグルタルアルデヒドで人工的に架橋したコラーゲンもそれぞれ同様に移植し、移植後の石灰化物の形成過程を組織学的に検討した。

その結果、熱変性BMGでは、3日目に出現したAMD様の球状石灰化物がBMG片の辺縁部から中央部に向かって経時的に数や大きさを増し、相互に融合しながら移植体全体を占めていった。熱変性脱灰歯でも同様の所見が得られたが、石灰化物は象牙質のエナメル質側から歯髄側に向かって一方向性に数や大きさを増していった。架橋コラーゲンでは、コラーゲン線維束の形状に沿った石灰化物が3日目に出現し、次第に周囲のコラーゲン線維を侵し、移植体の辺縁部から中央部に向かって移植体全体を占めていくのが観察された。軟骨組織や骨組織の形成はどの移植体でもみられず、破骨細胞様多核巨細胞による移植体の吸収やこれらの細胞の出現も認められなかった。石灰化物はいずれも微細な針状結晶の凝集体で、結晶の大きさに多少の差が認められたものの、成分分析ではいずれの石灰化物でも同様のカルシウム/リンのモル比を示し、またアパタイトの前駆体が次第に相変化していることも示唆された。

以上の結果より、AMDはBMGの移植後に骨組織形成に先行した形で生じるだけでなく、熱変性BMG、熱変性脱灰歯、および架橋コラーゲンの移植後にも生じることが明らかとなるとともに、AMDは非コラーゲン性蛋白とは無関係で、むしろ移植体の基質の架橋コラーゲンに依存して物理化学的に生じている可能性が示唆された。この研究は、石灰化の機構、特にコラーゲン線維の性状と石灰化との関係を解明する上で重要な知見を提供したものである。したがって、本研究は歯科医学の発展に寄与するところが極めて大であり、本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと考えられる。

論文表題

熱変性脱灰骨基質ゼラチン，熱変性脱灰歯，および
架橋コラーゲンの筋肉内移植後に認められた石灰化
の組織学的比較

著者：二 宮 雅 美

所属：徳島大学大学院歯学研究科
歯科保存学第二講座

（主任：永田 俊彦 教授）

論文表題

熱変性脱灰骨基質ゼラチン，熱変性脱灰歯，および
架橋コラーゲンの筋肉内移植後に認められた石灰化
の組織学的比較

著者：二宮雅美

所属：徳島大学大学院歯学研究科歯科保存学第二講座

（主任：永田俊彦教授）

キーワード：脱灰骨基質ゼラチン，象牙質，
コラーゲン，骨形成因子，石灰化

① 原著論文

② 原稿総枚数 53 枚（表題 1 枚，本文 35 枚，文献 7 枚，
図の説明 8 枚，英文抄録 2 枚）

写真 13 枚（図 1～図 13）

③ 連絡先 二宮雅美

（所属）徳島大学大学院歯学研究科

歯科保存学第二講座

電話（0886）31-3111（内線 5262）

②

熱変性脱灰骨基質ゼラチン，熱変性脱灰歯，および
架橋コラーゲンの筋肉内移植後に認められた石灰化
の組織学的比較

二宮雅美

徳島大学大学院歯学研究科

歯科保存学第二講座

(主任：永田俊彦教授)

緒言

1965年、Uristら¹⁾は脱灰骨基質を筋肉内や皮下に移植すると異所性に骨組織が形成されることを報告した。その後、この骨誘導現象が骨基質内に存在する蛋白性因子によることがわかり、彼らはこれを骨形成因子 (Bone morphogenetic protein: 以下 BMPと略記) と名付けた²⁾。以来、この因子の単離や精製が試みられ、1988年に Wozneyら³⁾がヒト BMPの遺伝子のクローニングに成功し、現在までに BMP-1~BMP-9までの9種類の BMPの存在が報告されている⁴⁾。

一方、脱灰骨基質の移植体周囲に生じる骨誘導現象の組織学的検索に関しては、Reddiらをはじめとする研究者により報告されている⁵⁻⁸⁾。Yamashitaらのグループ^{9, 10)}も、高い骨誘導活性を有し、かつ内因性酵素に対して安定である脱灰骨基質ゼラチン¹¹⁾

(Demineralized bone matrix gelatin: 以下 BMGと略記) を用いて筋肉内移植による骨誘導現象を組織学的に検索している。彼らはこの検索の過程で、1991年に骨誘導現象に先行して移植体内に球状の石灰化物が形成されることを発見し、これを Acellular Mineral Deposition (以下 AMDと略記) と名付けた¹²⁾。この名称は、石灰化物の形成の際、周囲に骨形成細胞や基

質小胞が観察されなかったこと、およびアルカリフォスファターゼ活性が陰性であったことに由来しており、「細胞の関与しない石灰化」という意味が含まれている。Yamashitaら¹³⁻¹⁷⁾は、AMDについてさらに組織学的に検討を加え、AMDが、(1)球状石灰化物が数や大きさを増し、相互に融合しながらBMG内の広領域を占めていく、(2)やがて破骨細胞様多核巨細胞により吸収される、(3)AMDの吸収とともに、BMG周辺に軟骨組織や骨組織の形成が認められる、(4)骨芽細胞の分化や後続する骨組織形成に間接的な役割を果たす可能性を有するなどの特徴を明らかにしてきた。

しかしながら、AMDの本態については、その形成機構を含め未だ不明な点や問題点が多く残されている。その一つはAMD形成にBMG内のBMPを含む非コラーゲン性蛋白が関係しているか否かであり、BMPによって誘導される骨組織形成が後続して生じるようなBMG移植例では、AMDの組織変化を単独で観察することが困難なことも研究上の大きな問題である。そこで著者は、

BMGに熱処理を加えてBMPを含む基質中の非コラーゲン性蛋白を失活させ、その失活がAMDに及ぼす影響を組織学的に観察することにした。

一方、AMDがBMGの移植後のみに生じる特殊な現象なのか、あるいは他の移植体や自然界にもみられる一般的な現象であるのか否かを解明することは、AMDの

本態を考える上で重要である。また、人工的に架橋したコラーゲンでもAMDを生じるか否かを検討することは、移植体の基質を構成する架橋コラーゲンとAMDとの関連を考える上で重要で、AMDでの石灰化機構を解明する上で不可欠なことと考えられる。以上のような観点から、本研究では、象牙小球という球状石灰化物が石灰化時に生じることの知られている象牙質¹⁸⁾や、皮下に移植後に形成される石灰化物がAMD様であることが生化学的に示唆されているグルタールアルデヒド架橋牛皮膚 type I コラーゲン¹⁹⁾についても、それぞれ筋肉内に移植し、移植体に生じる石灰化物とAMDとの関連を組織学的に検討した。

材料ならびに方法

1. 実験動物

日本チャールス・リバー（神奈川）より購入した雄の Sprague-Dawley 系ラット（以下 S.D. 系ラットと略記）を使用した。ラットは室温 22℃ 前後に保たれた飼育室のケージで飼育され、飼料としては実験動物用固形飼料 MF（オリエンタル酵母工業，東京）が、飲料水としては水道水が常時自由に与えられた。

2. 移植体の調製

1) 熱変性 BMG

BMG の作製方法は Urist ら¹¹⁾ の報告に従った。すなわち、総計 20 匹の S.D. 系ラット（生後 4 週齢，平均体重 80 g）の大腿骨と脛骨より骨端部を除去して骨幹部のみとし、骨髓、および骨周囲の骨膜や軟組織を 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）中ですばやく除去した後、同緩衝液にて洗浄した。ついで骨幹部をクロロホルム：メタノール（1：1）にて 1 時間脱脂後、4℃ で 0.6 N 塩酸にて 48 時間脱灰し、さらに 2.0 M 塩化カルシウムに 24 時間、0.5 M EDTA に 4 時間、8.0 M 塩化リチウムに 24 時間、ついで 55℃ の蒸留水中に 4 時間浸漬して可溶性蛋白を除去し、ゼラチン化した。この後、骨幹部を凍結乾燥し、Sample Chamber Heiko（アドバンテック東

洋，東京）にて粉碎してから Testing Sieve（Iida Manufacturing Co.，大阪）にかけて $75 \sim 500 \mu\text{m}$ 径の骨片を集め、再び凍結乾燥して BMG とした。最後に BMG をそれぞれ 2.0mg ずつ分注し、アルミ箔に包んで 150°C で 30 分間、2 回の熱処理を施して熱変性 BMG とした。

2) 熱変性脱灰歯

総計 30 匹の S.D. 系ラット（生後 18 日齢，平均体重 38g ）の下顎骨から歯根未完成の第一大臼歯を取り出し、 0.1M リン酸緩衝液（ $\text{pH} 7.4$ ）中で歯髄を含めた軟組織をすばやく除去した後、同緩衝液にて洗浄した。ついでクロロホルム：メタノール（1：1）で 1 時間脱脂後、3 日ごとに液を交換しながら 10 日間、第一大臼歯を 4°C の 0.6N 塩酸で脱灰し、さらに蒸留水で洗浄した後、凍結乾燥を行った。引き続き、脱灰歯に 150°C で 30 分間、2 回の熱処理を施し、熱変性脱灰歯とした。

3) 架橋コラーゲン

牛皮膚 type I コラーゲン（フナコシ，東京）を、 37°C の Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含のリン酸緩衝生理食塩水（ $\text{pH} 7.4$ ：以下 PBS（-）と略記）中で攪拌して線維状ゲルとした。ついで、線維状ゲルを 37°C で 30 分間、 6000rpm で遠心分離し、さらに 37°C の蒸留水中で攪拌して遠心する洗浄操作を 2 回行った後に凍結乾燥し、コラーゲンスポンジとした。このコラーゲンスポンジ

を、室温で3日ごとに液を交換しながら2週間、大量の0.15M NaCl含有の0.2%グルタルアルデヒド-0.05Mリン酸緩衝液(pH7.4)で架橋した。この後、未反応のグルタルアルデヒドを除去すべく、4℃で4時間ごとに液を交換しながら24時間、PBS(-)でコラーゲンスポンジを洗浄し、さらに蒸留水にて洗浄した。その後、凍結乾燥を行って架橋コラーゲンとし、2.0mgずつアルミ箔に包んで分注した。

3. 移植

総計90匹のS.D.系ラット(生後5週齢, 平均体重140g)をそれぞれ30匹ずつの3群に分け、ネンプタール(ペントバルビタールナトリウム 50mg/ml: 大日本製薬, 大阪)で麻酔(1mg/kg体重)後、無菌状態で腹部皮膚正中部に約1cmの縦切開を加え、白線より約5mm外側の両側腹直筋内にポケットを作成した。ついで、各群にそれぞれ2.0mgの熱変性BMG、2.0mgの架橋コラーゲン、および1歯の熱変性脱灰歯をポケット内に移植した(図1)。移植後、術後の感染を防ぐためペニシリンGカリウム(8万単位/kg体重: 明治製薬, 東京)を皮下に注射した。

4. 組織学的処置

移植後1, 3, 5, 7, 10, 14日目に、それぞれ各群5匹、

計 15 匹 の ラ ッ ト を 10 単 位 / ml ヘ パ リ ン ナ ト リ ウ ム
(Novo Industry, Denmark) 含 有 の 生 理 食 塩 水 (0.9
% NaCl) を 心 臓 を 通 し て 注 入 し 、 次 に 使 用 直 前 に 調 製
し た 2.5 % グ ル タ ー ル ア ル デ ヒ ド (片 山 化 学 工 業 , 大
阪) - 0.1 M リ ン 酸 緩 衝 液 (pH 7.4) を 用 い て 灌 流 固 定
し た 。 固 定 後 、 左 右 両 側 の 移 植 体 を 周 囲 の 筋 組 織 も 含
め て 取 り 出 し 、 一 側 を 光 学 顕 微 鏡 用 、 他 側 を 電 子 顕 微
鏡 用 と し て そ れ ぞ れ 試 料 を 作 製 し た 。

1) 光 学 顕 微 鏡 用 試 料 の 作 製 と 観 察

筋 組 織 も 含 め た 移 植 体 を 、 10 % 中 性 緩 衝 ホ ル マ リ ン
に 4 日 間 に わ た り 浸 漬 固 定 し た 。 固 定 後 半 日 間 水 洗 し 、
通 法 に 従 っ て ア ル コ ー ル 系 列 で 脱 水 し 、 パ ラ フ ィ ン に
包 埋 し た 。 な お 、 14 日 目 の 一 部 の 試 料 に つ い て は 、 石
灰 化 が 進 ん で 薄 切 が 困 難 な た め 、 ア ル コ ー ル 脱 水 に 先
行 し て 脱 灰 操 作 を 行 っ た 。 す な わ ち 、 Plank-Rychlo 液²⁰⁾
で 7 日 間 脱 灰 し て 5 % 硫 酸 ナ ト リ ウ ム で 12 時 間 中
和 し 、 さ ら に 半 日 間 水 洗 し た 。 つ い で パ ラ フ ィ ン に 包
埋 し た 試 料 を 4℃ で 冷 や し た 後 、 回 転 式 ミ ク ロ ト ー ム
(ヤ マ ト 工 機 , 大 阪) を 用 い て 厚 さ 5 μ m の 連 続 切 片
に し た 。 切 片 に は 、 Delafield の ヘ マ ト キ シ リ ン 液²¹⁾
と 1 % エ オ ジ ン 溶 液 に よ る 二 重 染 色 (以 下 HE 染 色 と 略
記) 、 あ る い は 石 灰 化 の 状 態 を 観 察 す る た め の ア リ ザ
リ ン レ ッ ド S 染 色²²⁾ を 施 し 、 光 学 顕 微 鏡 に て 観 察 を
行 っ た 。

2) 電子顕微鏡用試料の作製と観察

各日・各群の5匹の移植体のうち、3匹分を透過型電子顕微鏡用、残り2匹分を走査型電子顕微鏡用として使用した。

① 透過型電子顕微鏡用試料の作製と観察

筋組織を含めた移植体を細切して10ml容量のバイアル瓶にいれ、前固定として2.5%グルタールアルデヒド(和光純薬工業, 大阪) - 0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)に4℃で2時間浸漬し、4℃の0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で10分ごとに液を交換しながら2時間洗浄した。ついで2%四酸化オスミウム(第一化学薬品, 東京) - 0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて4℃で1時間にわたり後固定した。以下通法に従い、冷アルコール系列で脱水し、エポン812樹脂(TAAB LABORATORIES)中に包埋した。包埋試料をウルトラミクロトーム(LKB: Bromma, Sweden)を用いて1 μ mの切片を作製し、トルイジンブルー染色あるいはアリザリンレッドS染色を施して観察部位の同定を行った。さらにトリミングを行った後、ダイヤモンドナイフ(日新EM, 東京)を装着したウルトラミクロトームを用いて超薄切片を作製した。引き続き、超薄切片に酢酸ウラニル・50%エタノール溶液とREYNOLDS液^{2,3)}による二重染色を施し、透過型電子顕微鏡H-800(日立製作所, 東京)により各移植体の石灰化物と周囲の基

質の観察を行った。

② 走査型電子顕微鏡用試料の作製と観察

移植体周囲の筋組織を可及的に除去して移植体のみとし、これを2～3分割して10ml容量のバイアル瓶にいれ、透過型電子顕微鏡用試料と同様に2.5%グルタルアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で前固定し、ついで2%四酸化オスミウム-0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で後固定した。引き続き、通法に従い冷アルコール系列で脱水し、室温の酢酸イソアミル(和光純薬工業, 大阪)で透徹した。さらに、臨界点乾燥装置HCP-2型(日立工機, 東京)を用いて臨界点乾燥を行い、イオンコーターIB-3(Eiko engineering Co., LTD., 東京)で6mA、4分間金蒸着し、走査型電子顕微鏡S-700(日立製作所, 東京)にて各移植体の石灰化物の観察を行った。

5. エレクトロンプローブX線微小分析

各群7日目の透過型電子顕微鏡用超薄切片の石灰化が起こっている部位において、石灰化物の成分分析を行った。分析には透過型電子顕微鏡H-500に連結したケベックエナジー分散X線分析装置(日立製作所, 東京)を使用し、10KeV、100秒間の条件下で、各群の各部位において20回ずつの分析を行った。

結果

I. 光学顕微鏡所見

移植体周辺の組織はHE染色切片、移植体内での石灰化はアリザリンレッド染色切片に基づいて観察した。

1) 熱変性 BMG

(1) 移植体周辺の組織

図2Aは移植後1日目の移植体と周辺の組織像を示したものである。移植体は、均一な染色性を示す直径

100～300 μ mのBMG片が数個集合したもので、各BMG片は50 μ m前後の間隙で近接していた。BMG片間の間隙はフィブリン網で満たされ、血球細胞が著しく浸潤していた。

移植後、BMG片間のフィブリン網と血球細胞の浸潤は、経時的に紡錘形の単核細胞を含む結合組織に置き換えられ、7日目以後ではBMG片は完全にこの結合組織で囲まれるようになった。図3Aは移植後14日目の組織像である。BMG片は結合組織により完全に囲まれていた。

(2) 移植体内での石灰化 (図4)

移植後1日目では、石灰化を示すアリザリンレッド濃染部位は全く認められなかった(図4A)。3日目では、大部分のBMG片にアリザリンレッドに強陽的な球

状石灰化物が多数出現した。球状石灰化物はBMG片の辺縁部に多く、相互に近接し、BMG片の中央部ではまばらであった。また、中央部の球状石灰化物は、辺縁部のものに比べてやや小さいものが多く認められた（図4B）。さらに、球状石灰化物は辺縁部から中央部に向かって経時的にその数を増し、相互に融合して不規則な多角形の石灰化物を形成するようになった。7日目には、BMG片全体が石灰化したものもみられ、ほとんどのBMG片の辺縁部は高度に石灰化して不規則な形態を呈していた（図4C）。石灰化はこの後も進み、14日目ではほとんどのBMG片全体が、高度に石灰化した多角形の石灰化物で満たされていた（図4D）。

2) 熱変性脱灰歯

(1) 移植体周辺の組織

図2Bは移植後1日目の組織像を示したものである。実験で使った歯は、歯冠の形成は進行していたものの、歯根は十分に形成されていなかった。熱変性脱灰歯はこの形態のまま移植されており、移植体の断面に象牙細管が明瞭に認められたが、脱灰処理のためエナメル質は認められなかった。移植体のエナメル質側では、血球細胞を含むフィブリン網が発達し、咬頭間の陥凹はフィブリン網で満たされていた。歯髄側でもフィブリン網が歯髄腔を満たしつつあったが、エナメル質側よりまばらで、血球細胞はほとんどみられなかつ

た。

移植後、移植体のエナメル質側のフィブリン網は、咬頭間以外の領域から次第に紡錘形の単核細胞を含む結合組織に置き換えられ、5日目以後は、この結合組織が移植体に接していた。移植体の歯髄側では、移植後5日目まで血球細胞を含むフィブリン網がみられたが、7日目までにはエナメル質側と同じ結合組織で置き換えられた。図3Bは移植後14日目の組織像である。移植体の表層には、歯髄側で特に厚い結合組織が認められた。

(2) 移植体内での石灰化 (図 5)

移植後1日目では石灰化部位は全く認められなかった(図5A)。3日目では、エナメル質側の象牙質表層に一層の石灰化層がみられ、やや深層には球状石灰化物が散在性に認められる部位も存在した(図5B)。しかしながら、歯髄側の象牙質には石灰化部位は全く認められなかった。これより以後では球状石灰化物は次第に歯髄側へと広がり、7日目では歯髄側を除く象牙質の約3分の2の部分が球状石灰化物で占められた(図5C)。石灰化はこの後もさらに歯髄側へと進み、14日目では、歯髄側を含む象牙質の全層が、相互に融合した球状石灰化物で占められた(図5D)。

3) 架橋コラーゲン

(1) 移植体周辺の組織

図 2C は移植後 1 日目の組織像を示したものである。移植体は、多孔性のコラーゲン線維束が広い間隙をはさんで何層にも重なって構成されていた。移植体表層のコラーゲン線維束の周囲には発達したフィブリン網が広がり、血球細胞がフィブリン網の内部に多数観察された。移植体中央のコラーゲン線維束の周囲には血球細胞は少なく、フィブリン網も疎であった。

この後、移植体中央のコラーゲン線維束の周囲でもフィブリン網が発達し、血球細胞も浸潤したが、7 日目以後では、血球細胞の浸潤を残して、フィブリン網は、紡錘形の単核細胞を含む結合組織に移植体表層から置き換えられていった。図 3C は移植後 14 日目の組織像である。移植体を構成するコラーゲン線維束間には血球細胞の浸潤がみられ、移植体周辺には結合組織が認められた。

(2) 移植体内での石灰化 (図 6)

移植後 1 日目では石灰化部位は全く認められなかったが (図 6A)、3 日目では、石灰化域が移植体の特に辺縁のコラーゲン線維束に散在性に認められた (図 6B)。これらの領域では、石灰化がコラーゲン線維束の長軸に沿い、また隣接するコラーゲン線維束にもわたることが観察された。以後、各石灰化域では、石灰化がコラーゲン線維束の長軸に沿って、また隣接するコラーゲン線維束へも拡大し、相互に融合する傾向を示し

た（図 6C）。14日目では移植体の石灰化はさらに進み、石灰化域が移植体のほぼ全体を占めていた（図 6D）。

図 3は各移植体での14日目のHE染色像を示したものであるが、いずれの移植体においても、移植体の周辺には、この時期になっても軟骨芽細胞や骨芽細胞の出現、さらに軟骨組織や骨組織の形成は全く認められなかった。また、破骨細胞様多核巨細胞の出現、およびこれらの細胞による移植体の吸収像も全く観察されなかった。

一方、図 7は各移植体での石灰化物を強拡大で比較したものである。いずれも、石灰化物は移植後3日目から生じ、7日目以降には移植体の全体を占めるようになったが、形状や拡大様式は移植体で異なっていた。熱変性BMGでは、最初球状石灰化物がBMG片の辺縁部に出現し（図 7A）、数や大きさを増して相互に融合し、次第にBMG片の中央部へと分布域を拡げた（図 7B）。熱変性脱灰歯では、一層の石灰化層がエナメル質側の象牙質表層にみられ（図 7C）、そこから続く球状石灰化物が数や大きさを増して相互に融合し、次第に歯髄側へと分布域を拡げた（図 7D）。架橋コラーゲンでは、コラーゲン線維束の形状に沿った石灰化物が、移植体の辺縁部のコラーゲン線維束から散在性に出現し始めた（図 7E）。石灰化物はコラーゲン線維束の長軸に沿

い、また隣接するコラーゲン線維束にも拡大して相互に融合し、次第に中央部へと分布域を広げた（図7F）。

II. 透過型電子顕微鏡所見

1) 熱変性 BMG

図8は移植後3, 5, 7日目の移植体内部の石灰化物を示したものである。3日目では、直径 $1-5\mu\text{m}$ の球状石灰化物が散在し（図8A）、5日目ではそれらが増加し、かつ成長して直径 $8\mu\text{m}$ のものも認められた（図8B）。

7日目では石灰化物はさらに増加し、移植体の大部分を占めるようになった。これらは相互に融合して球状を呈さず、境界が不明瞭となった（図8C）。

2) 熱変性脱灰歯

図9は移植後5, 7, 10日目の象牙質のやや深層での石灰化物を示したものである。3日目でも石灰化物は観察されたが、形態が不明瞭であった。5日目では、直径 $4-8\mu\text{m}$ のほぼ球状の石灰化物が散在性に観察された。しかし、一部には楕円形状あるいはやや不定形を示すものもあった（図9A）。7日目では、球状石灰化物は増加し、かつ成長して直径 $6-8\mu\text{m}$ となった。これらは相互に融合して大きな石灰化物へ移行し、境界も不明瞭となった（図9B）。10日目になると石灰化物はさらに増加して融合し、移植体の広領域を占めるようになった（図9C）。なお、球状石灰化物には、電子透過性

の低い部分が島状に随所にみられ、一部は管状の細かい空隙を介して周囲の基質と連絡していた（図 9 矢印）。

3) 架橋コラーゲン

図 10 は移植後 3, 5, 7 日目の石灰化域を示したものである。3 日目では細片線維様の石灰化物の集合する石灰化域が非石灰化コラーゲン線維間に散在するのが観察された。石灰化物の走行は非石灰化コラーゲン線維とほぼ同じであった（図 10A）。5 日目では石灰化物は増加して隣接する非石灰化コラーゲン線維を侵し、面積の大きな多孔性の石灰化域が出現した（図 10B）。7 日目では石灰化域はさらに拡大して相互に融合し、移植体の広領域を占めるようになった（図 10C）。

図 11 は、移植後 7 日目の各移植体での石灰化物と周囲の微細構造を高倍率で示したものである。熱変性 BMG（図 11A）では、球状石灰化物は直径 $0.02-0.04 \mu\text{m}$ で長さ $0.20-0.30 \mu\text{m}$ 程度の針状結晶が密集して形成されていた。石灰化物周囲のコラーゲン線維を観察すると、大部分の線維が散開していた。熱変性脱灰歯（図 11B）では、球状石灰化物は直径 $0.01-0.02 \mu\text{m}$ で長さ $0.10-0.20 \mu\text{m}$ 程度の針状結晶が密集して形成されていた。石灰化物周囲のコラーゲン線維の状態は、熱変性 BMG の場合とほぼ同じであった。一方、架橋コラーゲン（図 11C）では、石灰化物は計測不能な程細かい

針状結晶が密集して形成されていた。石灰化物周囲のコラーゲン線維の状態は、D周期をもち走行にほぼ一定の方向性がみられ、熱変性BMGや熱変性脱灰歯のような散開はほとんど認められなかった。

Ⅲ．走査型電子顕微鏡所見（図12）

各移植体での移植後7日目の石灰化域を比較した。

1) 熱変性BMG

図12AとBは移植体表層からやや深部の石灰化域を示したものである。石灰化域には直径4-8 μ mの球状石灰化物が多数存在し、多くは相互に融合して不定形の大きな石灰化物を形成していた。

2) 熱変性脱灰歯

図12Cはエナメル質側の象牙質の石灰化域を示したものである。最表層の石灰化層は球状石灰化物が密集して形成されており、石灰化物間の境界が不明瞭になるほど融合の進んだ領域も随所に認められた。やや深部では、直径5-7 μ m程度の少し歪んだ球状の石灰化物が、柱状に密集する象牙細管の間に散在していた。しかしながら、象牙細管が石灰化物を避けるような像はみられず、象牙細管やその側枝と思われるヒモ状の構造物が石灰化物を貫いたり、石灰化物にはさみこまれたりする所見が随所に認められた（図12D）。透過型電子顕微鏡像（図9）でみられた石灰化物内の電子

透過性の低い島状の部分は、このような所見に対応していた。

3) 架橋コラーゲン

架橋コラーゲンの移植体は、弱拡大では、薄板状に集まったコラーゲン線維束が幾層にも重なった像を呈しており（図 12E）、その薄板を強拡大で観察すると、コラーゲン線維が束をなして網目状に配列していた（図 12F）。この所見は、光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡でみられた多孔性の石灰化像とほぼ一致していたが、石灰化している部位を明確に区別することはできなかった。

IV. エレクトロンプローブ X 線微小分析（図 13）

各移植体の移植後 7 日目の石灰化物について X 線微小分析を行った。すべての石灰化物において、カルシウムとリンに相当する 2 本のピークが検出され、それぞれカルシウムのリンに対するモル比は、いずれの移植体の石灰化物においても大部分が約 1.0 であった（図 13A, B, C）。しかし、熱変性 BMG や熱変性脱灰菌の比較的大きな（直径 $6 \sim 8 \mu\text{m}$ ）球状石灰化物の中心部、および架橋コラーゲンの石灰化域の中心部においてはモル比が約 1.3（図 13 D, E, F）で、カルシウムの比率が増加する傾向が認められた。

考 察

1. 熱変性 BMGで認められた石灰化

熱変性 BMGを移植後に移植体内で認められた石灰化物は、形成時期や形成時の状況、微細構造、および拡大様式において、未変性 BMGを移植後に認められた AMD^{1,2-17)}と共通していた。すなわち、いずれにおいても移植後 3～5日目に、骨形成細胞やこれらが分泌する基質小胞が存在することなく、カルシウムとリンを含む微細な針状結晶の密集した石灰化物として生じ、経時的に数や大きさを増し、相互に融合しつつ移植体の広領域を占めていった。このことは、AMDと同じ現象が、BMPを含む非コラーゲン性蛋白を熱処理で失活させた BMGの移植後にも生じること、すなわち、AMDが、BMG内の非コラーゲン性蛋白とは無関係に生じ得ることを示している。

一方、熱変性 BMG移植後の AMDが、未変性 BMG移植後の AMDと異なる点が二つあげられる。一つは、前者では骨誘導現象が後続しないことで、このことは熱処理で BMPが失活していることと関連しており、軟骨組織や骨組織の形成を混在することのない AMDのみの観察を可能にしている。他の一つは、未変性 BMGでは、破骨細胞様多核巨細胞による AMDの吸収が移植後 7日

目頃から生じるのに対し、熱変性 BMGでは、7日目以降になっても吸収が生じず、破骨細胞様多核巨細胞の出現さえ認められないことである。これらの結果は、破骨細胞様多核巨細胞の出現が、BMG中に含まれる

BMPなどの蛋白と何らかの関連をもつことを示唆している。BMP-3や BMP-4がヒトの単球/マクロファージの走化性を刺激するという報告²⁴⁾を除き、BMPと破骨細胞の関連を示す報告はない。しかし、破骨細胞の分化には、骨芽細胞様細胞の産生するマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)の必要なことがOP/OPマウスでの実験から知られている²⁵⁻²⁹⁾。また、前破骨細胞や破骨細胞が骨芽細胞様細胞、および細長い突起を有する線維芽細胞様細胞に常に近接すること^{30, 31)}、さらに、破骨細胞の増殖と分化に関与する副甲状腺ホルモン、上皮増殖因子、インターロイキン-1などの骨吸収刺激因子の受容体の多くが、破骨細胞やその前駆体ではなく骨芽細胞様細胞に存在すること³²⁾から、破骨細胞の分化には骨芽細胞や骨芽細胞の前駆体との相互作用が重要であることが指摘されている。すなわち、熱変性 BMGで破骨細胞様多核巨細胞が出現しなかったのは、BMPの失活により骨芽細胞への分化が認められなかったことの間接的な影響と考えられる。

脱灰骨基質などを移植した場合、移植体周辺では骨誘導現象が認められる⁵⁻¹⁷⁾。しかし、骨誘導現象と

は別の移植体内での石灰化の報告は少なく、

Yamashitaら¹²⁻¹⁷⁾の報告した未変性BMG内での石灰化(AMD)以外には、FirsheinとUrist³³⁾による脱灰骨基質にみられた石灰化、およびLinden³⁴⁾による脱灰骨基質や脱灰歯にみられた石灰化が報告されているのみである。FirsheinとUrist³³⁾の報告では、移植体内に石灰化が生じていることを述べているにすぎず、またLinden³⁴⁾の報告では、骨組織形成に先行して移植体内に石灰化が生じていることを述べているが、彼はそれ以上、この石灰化について詳細な観察を行っていない。このように、彼らが報告した石灰化と

Yamashitaら¹²⁻¹⁷⁾の報告したAMDとの関連については不明な点が多い。移植体内での石灰化に触れた研究論文が大変少ない原因としては、他の研究者は

Yamashitaら¹²⁻¹⁷⁾、FirsheinとUrist³³⁾およびLinden³⁴⁾の報告のような非脱灰標本を用いた観察を行わず、脱灰標本のみで観察したことにより、移植体内での石灰化を見落としてしまった可能性が考えられる。現在のところ、Yamashitaら¹²⁻¹⁷⁾のように、移植体内部にも着目して、移植直後からの組織変化を非脱灰標本で詳細に観察した報告は他になく、また、

AMDの形成がなくても骨誘導現象が生じ得ることを明確に示した報告は、調べた限りでは見当たらない。一方、in vitroの実験から、未成熟な骨芽細胞様細胞や

未分化な非骨原性細胞に BMP を単独に作用させた場合、BMP がアルカリフォスファターゼ活性やコラーゲン合成を促進させたり、また、副甲状腺ホルモン依存性 cAMP を上昇させたり、オステオカルシンの産生を誘導するなどして、上記細胞の骨芽細胞への分化を促進させることが知られており³⁵⁻⁴¹⁾、移植体によっては、AMD の発現がなくても骨誘導現象を生じ得ることは十分に考えられる。

しかしながら、AMD と骨誘導現象が相前後して生じるような移植体では、後続する骨誘導現象に AMD が何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

Yamashita ら¹⁷⁾ は、石灰化阻害剤である Ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (以下 EHDP と略記) を用いて未変性 BMG 内に生じる AMD を阻害し、後続する骨誘導現象への影響を調べている。彼らの報告によると、移植体周辺では、未成熟な骨芽細胞や軟骨細胞が認められ、また、移植体を吸収する破骨細胞様多核巨細胞の出現も認められているが、その数は少なく波状縁や明帯を持たない活性の低いものであった。細胞の分化や活性に関するこれらの抑制所見が EHDP の直接作用によるとは考えにくく、彼らは石灰化抑制の二次的影響ではないかと推察している。すなわち、AMD が存在すると破骨細胞の活性が高められ、カップリング現象により骨芽細胞の活性も高められて骨誘導が促進される

ものと考察している。この考察に基づけば、AMDは骨誘導現象に不可欠ではないものの、これを促進させる補助的役割を担っている可能性が強い。

2. 熱変性脱灰菌で認められた石灰化

熱変性脱灰菌を移植後、移植体内で認められた石灰化物は、形成時期や形成時の状況、微細構造、および拡大様式において、未変性BMGや熱変性BMGでみられたAMDと共通していた。このことは、AMDが決してBMGのみに生じる特殊な現象ではないことを示している。BMGでは、BMP活性を最大限に引き出すべく、脱灰処理以外に、塩化カルシウムやEDTA、さらに塩化リチウムなどによる可溶性蛋白の除去やゼラチン化という複雑な処理が施されている。しかしながら、塩酸処理のみの脱灰骨基質や脱灰菌の移植でも、出現はかなり遅れるもののAMD様の石灰化物が移植体内に生じることが知られている^{3,4)}。さらに本研究で、塩酸脱灰菌に熱処理のみを施した熱変性脱灰菌でもAMDが出現したことは、可溶性蛋白の除去やゼラチン化といった処理が移植体に与えた変化がAMDの発現に関係していないことを示している。なお、Linden^{3,4)}による熱処理を施していない脱灰菌の移植では、AMD様の石灰化に続いて骨誘導現象が生じている。熱処理によるBMPの失活が骨誘導現象を阻害することは、このことから

明らかである。

一方、熱変性脱灰歯移植後のAMDが未変性や熱変性BMGでのAMDと大きく異なる点は、後者ではAMDがBMG片の辺縁部から中央部に向かって拡大するのに対し、前者では象牙質のエナメル質側から歯髄側へとAMDが存在域を拡げていくことである。この理由として、組織液が移植体のエナメル質側よりも歯髄側に浸潤しにくいことがあげられる。しかしながら、移植体周辺の歯髄側での組織変化の遅れはエナメル質側に比べて2～3日に過ぎず、エナメル質側の象牙質では移植後3日目に石灰化物が出現するのに対して、歯髄側の象牙質では14日目近くになってはじめて出現するという遅れをこの点だけで説明するのは難しい。熱変性脱灰歯のAMDの存在域の拡大は、明らかにエナメル質側表層から始まる一方向性のものである。この研究結果は、歯髄側の象牙質に本質的に石灰化を妨げる要因のある可能性を示唆している。熱変性脱灰歯では塩酸による脱灰処理のみで、基質そのものの構造が余り破壊されていないことを考えると、歯髄側の象牙質に対応する象牙前質にそのような要因が存在するのではないかと推察される。

BMPを含む非コラーゲン性蛋白、さらには骨形成細胞や基質小胞が関与しないAMDでは、移植体の基質コラーゲンが石灰化に中心的な役割を果たしていると推

測される。熱変性脱灰歯のAMDを構成する針状結晶が、基質コラーゲンの存在しない象牙細管内にみられないのはこのことに関連すると思われる。一般にコラーゲン線維は、コラーゲン分子が1/4ずつずれて凝集し、さらに架橋によって強化されている⁴²⁾が、架橋の種類は、同じtype Iコラーゲンでも、皮膚などの軟組織のものと骨や象牙質などの硬組織のものでは異なっている。軟組織のコラーゲンでは、ヒスチジノヒドロキシリジノノルロイシン（以下HHLと略記）に代表される架橋により、コラーゲンの分子間距離がかなり制限され、ミネラルイオンが侵入しにくい構造となっている^{43, 44)}。これに対して硬組織のコラーゲンでは、軟組織のコラーゲンに比べ分子間距離が広く、ミネラルイオンの侵入が容易といわれている⁴⁵⁾。骨や象牙質のコラーゲンでの架橋として、ジヒドロキシリジノノルロイシン（以下DHLNLと略記）などが知られている⁴⁵⁾が、同じ硬組織内でも、類骨や象牙前質といった非石灰化部位では架橋の種類が異なり、ピリジノリンと呼ばれる三本鎖架橋がこれらの部に集中することが報告されている⁴⁶⁾。ピリジノリンはDHLNLを前駆体として生じ、構造的には安定で、二本鎖架橋のDHLNLより分子間距離が狭いためミネラルイオンの侵入が制限をうけるといわれている^{47, 48)}。すなわち、熱変性脱灰歯の歯髄側の象牙質では、象牙前質での架橋構造

が脱灰や熱処理を経ても保持されており、これにより同部からのミネラルイオンの侵入が阻まれた可能性が考えられる。

一方、象牙質の石灰化には象牙芽細胞の分泌する基質小胞が関与するといわれている¹⁸⁾。石灰化は象牙芽細胞からある程度離れた基質から始まり、象牙芽細胞と石灰化前線との間には、石灰化の生じていない象牙前質が介在する。また、基質小胞の他に象牙芽細胞が分泌する代表的な非コラーゲン性蛋白のホスフォホリンも、カルシウムときわめて高い結合能を有しており、石灰化部位に限局して存在することから石灰化に重要な役割を果たしていることが指摘されている¹⁸⁾。しかし本研究では、象牙質の石灰化前線でみられる象牙小球様の球状石灰化物が、ホスフォホリンなどの石灰化制御蛋白を失活した熱変性脱灰歯の象牙質内に基質小胞と無関係に出現し、象牙質を満たしていった。この所見は、通常 of 象牙質の石灰化過程においてAMDと同様の機序が働いている可能性も考えられることを強く示唆している。

3. 架橋コラーゲンで認められた石灰化

熱変性BMGや熱変性脱灰歯の移植後の所見は、移植体の基質を構成する架橋コラーゲンがAMD形成に関与していることを強く示唆している。そこで本研究では、

グルタールアルデヒドで人工的に架橋した牛皮膚 type I コラーゲンを筋肉内に移植し、移植体に生じる石灰化を観察した。その結果、この場合でも、移植後 3 日目頃から、周囲に骨形成細胞や基質小胞が存在しなくてもカルシウムやリンを含む微細な針状結晶が密集した石灰化物を移植体内に生じ、経時的に移植体の広領域を占めていく所見が認められた。この所見は、AMD と同じ現象がグルタールアルデヒド架橋コラーゲンの移植後にも生じることを示している。BMP などの非コラーゲン性蛋白を含まないこの移植体で、AMD 形成後に骨誘導現象が生じなかったことは明らかである。

このグルタールアルデヒド架橋コラーゲンに関しては、これを皮下に移植後に生じた石灰化物と、脱灰骨基質を移植後に、移植体周囲に形成された骨組織の石灰化とを生化学的に比較した Nimni ら¹⁹⁾の報告がある。この報告によると、グルタールアルデヒド架橋コラーゲン移植後の石灰化物では、骨形成過程での石灰化と異なり、アルカリフォスファターゼ活性やオステオカルシンの蓄積が認められなかったことが述べられている。また、Nimni ら¹⁹⁾の報告や本研究で、HHL などの通常の架橋では石灰化を生じない皮膚の type I コラーゲンであってもグルタールアルデヒドで架橋すれば移植後に石灰化を生じたことは、この石灰化がコラーゲンの架橋構造に大きく依存していることを示唆

している。さらに、架橋させていないコラーゲンを移植した場合には石灰化物を生じないという報告⁴⁹⁾からも、コラーゲンの架橋構造が石灰化に重要な役割を担っていることは十分に考えられる。硬組織のコラーゲンにみられる架橋は、軟組織のコラーゲンの架橋に比べてコラーゲンの分子間距離が広く、ミネラルイオンを通し易いことが知られている⁴⁵⁾ことから、グルタールアルデヒド架橋では、皮膚で通常みられる架橋に比べ分子間距離が広いものと考えられる。なお、牛の腱の type I コラーゲンでは、グルタールアルデヒド架橋以外にホルムアルデヒドで架橋して皮下に移植した場合にも、石灰化を生じることが知られている⁵⁰⁾。

一方、架橋コラーゲンの移植後にみられた石灰化では、石灰化物は熱変性 BMG や熱変性脱灰歯でみられたような球状を示さなかった。この理由は明らかではない。しかし、透過型電子顕微鏡での観察によると、種々の処置後の移植体の基質コラーゲンの状態は熱変性 BMG や熱変性脱灰歯と架橋コラーゲンとの間で異なり、前者ではコラーゲン線維の大部分が種々の方向に散開していたのに対し、後者では、コラーゲン線維は方向性をもって束をなし、散開はほとんど認められなかった。この所見は、移植体での基質コラーゲンの状態、すなわち、散開しているか一定方向に走行しているかによって、AMDでの石灰化物の形態が左右される可能

性を示唆している。また、石灰化物を構成する針状結晶の大きさも移植体により異なり、熱変性 BMG で最も大きく、熱変性脱灰歯がこれに次ぎ、架橋コラーゲンでは計測不能なほど細かった。このことについても基質コラーゲンの状態との関連が考えられるが、AMD での石灰化物の形態も含め、基質コラーゲンの状態と AMD との関連については今後の検討課題である。

4. AMD における石灰化の機序

熱変性 BMG、熱変性脱灰歯、および架橋コラーゲンを筋肉内に移植後の AMD を調べた本研究の結果は、基質の架橋コラーゲンの環境さえ充分であれば、硬組織形成細胞やこれらが分泌する基質小胞、非コラーゲン性蛋白、およびアルカリフォスファターゼが関与しなくても、物理化学的にミネラルイオンが析出され、結晶形成が誘導され得ることを示唆している。架橋コラーゲンの環境として、コラーゲンの分子間距離が、ミネラルイオンを通して結晶成長へ導くのに適当な広さであることが挙げられる。しかしながら、架橋させていない type I コラーゲンでは石灰化を生じなかったという報告^{4,9)}を考えあわせると、単に分子間距離が広ければ石灰化を生じるというわけではないことが推測される。最近、Katsura^{51, 52)}は「ナノスペースセオリー」と呼ばれる石灰化機序を提唱している。これに

よると、ナノメートル・レベルの空隙を備えた基質は、高分子性の石灰化阻害物質は通さないものの、ミネラルイオンは析出され、結晶への成長を導くと報告されている。すなわち、高分子性の石灰化阻害物質に対しては閉鎖系で、ミネラルイオンに対しては解放系であるような環境では、組織液中のミネラルイオンが物理化学的に析出され得るとする説である。

一方、AMDと同様の石灰化機序が、骨や象牙質などの通常の硬組織の形成過程においても生じている可能性は十分に考えられ、象牙質の石灰化過程で生じる象牙小球と、熱変性脱灰歯の移植後の石灰化物との形態的な類似性はその一つの表われともいえる。この可能性を考慮にいと、硬組織の形成過程は次のように解釈することができる。すなわち、硬組織形成細胞は、最初、石灰化の環境としては未成熟なコラーゲンをまず産生し、類骨や象牙前質に対応する幼若な基質を形成する。ついで、このコラーゲンが何らかの作用により架橋構造的に変化をきたし、石灰化の可能な成熟基質が形成され、この基質に物理化学的にミネラルイオンが沈着することによって石灰化が進行するという解釈である。この解釈に類似した考え方は、久保木⁵³⁾により石灰化の三段階説として報告されているが、本研究の結果からでは、それを立証するような明らかな結論を見い出すことはできない。しかしながら、今後、

架橋コラーゲンの微細構造や架橋形態とAMDとの関連をより詳細に研究することは、生体内での硬組織形成機序、特に架橋コラーゲンが石灰化機構に果たす役割を解明する上で重要な意義をもつものと思われる。

結 論

熱変性 BMG、熱変性脱灰歯、架橋コラーゲンをそれぞれ筋肉内に移植し、移植後に認められる石灰化について組織学的検索を行い、以下の結果を得た。

- 1) 熱変性 BMGでは、AMDに相当する球状石灰化物が移植後3日目より出現し、BMG片の辺縁部から中央部に向かって経時的に数や大きさを増し、相互に融合しながら、14日目には移植体全体を占めた。この所見は、AMDがBMG内のBMPを含む非コラーゲン性蛋白と無関係に生じることを示すものであった。
- 2) 熱変性脱灰歯でも、AMDに相当する球状石灰化物が移植後3日目より出現し、エナメル質側の象牙質表層から歯髄側に向かって数や大きさを増し、相互に融合しながら、14日目には移植体全体を占めた。また、石灰化物は象牙細管内には生じず、周囲の基質コラーゲン内に形成されていた。この所見は、AMDがBMGに決して特有な現象ではないこと、およびAMDの形成に基質コラーゲンが関与している可能性を示すものであった。
- 3) 架橋コラーゲンでは、コラーゲン線維束の形状に沿った石灰化物が移植後3日目より出現し、隣接

するコラーゲン線維束へと石灰化域を広げ、移植体の辺縁部から中央部に向かって相互に融合しつつ、14日目には移植体全体を占めた。

4) 熱変性 BMG、熱変性脱灰歯、および架橋コラーゲンのいずれにおいても、移植後に軟骨組織や骨組織の形成、すなわち骨誘導現象は認められなかった。この所見は、これらの移植体が AMD の組織変化を単独に観察する有効な実験系であることを示すものであった。また、いずれの移植体でも、石灰化物の吸収は認められず、破骨細胞様多核巨細胞の出現もみられなかった。

5) 移植後に生じた石灰化物は、いずれも微細な針状結晶の凝集体で、結晶の大きさは、熱変性 BMG > 熱変性脱灰歯 > 架橋コラーゲンの順であった。また、いずれの石灰化物も、カルシウム／リンのモル比は約 1.0あるいは 1.3であった。この所見は、石灰化物内でアパタイトの前駆体が次第に相変化していることを示すものであった。また 3) ~ 5) の結果から、架橋コラーゲンの移植後に生じる石灰化も、基本的には他の 2つの移植体による石灰化と同じ現象である可能性が示唆された。

6) 石灰化物周囲のコラーゲン線維は、熱変性 BMGと熱変性脱灰歯では大部分の線維が散開していたが、架橋コラーゲンでは散開はほとんどみられず、一

定の方向性を示していた。この所見は、移植体の基質コラーゲンの状態がAMDでの石灰化物の形態に影響を及ぼす可能性を示すものであった。

本研究の結果から、AMDはBMGの移植後に骨誘導現象に先行した形で生じるだけでなく、熱変性BMG、熱変性脱灰歯、および架橋コラーゲンの移植後にも生じることが明らかになるとともに、AMDは非コラーゲン性蛋白とは無関係で、むしろ移植体の基質の架橋コラーゲンの構造に依存して物理化学的に生じている可能性が示唆された。また、熱変性脱灰歯でのAMDと、象牙質の石灰化時に生じる象牙小球との形態的類似性より推測すると、AMDが生体内での石灰化現象に何らかの形で関わっている可能性が考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始御指導を賜った歯科保存学第二講座永田俊彦教授、口腔解剖学第一講座北村清一郎教授に深甚なる謝意を表しますとともに、本論文の御校閲に際し御指導を賜った口腔病理学講座林良夫教授に深謝申し上げます。また、本研究の実施に際し御指導を戴いた口腔解剖学第一講座山下菊治助教授に厚く御礼申し上げますとともに、研究の立案に際し御助言を賜った若野洋一名誉教授ならびに高木知道前教授に深謝申し上げます。最後に研究の遂

文献

- 1) Urist M R: Bone: formation by autoinduction. Science 150, 893-899 (1965)
- 2) Urist M R and Strates B S: Bone morphogenetic protein. J Dent Res 50, 1392-1406 (1971)
- 3) Wozney J M, Rosen V, Celeste A J, Mitsock L M, Whitters M J, Kriz R W, Hewick R M and Wang E A: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 242, 1528-1534 (1988)
- 4) Reddi A H/滝田裕子(訳): 骨形成蛋白質(BMP)による骨形成カスケードの開始. 蛋白質 核酸 酵素 40, 467-474 (1995)
- 5) Reddi A H and Anderson W A: Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification and hemopoiesis. J Cell Biol 69, 557-572 (1976)
- 6) Nilsen R: Electron microscopy of induced heterotopic bone formation in guinea pigs. Arch Oral Biol 22, 485-493 (1977)
- 7) Nilsen R: Electronmicroscopic study of mineralization in induced heterotopic bone formation in guinea pigs. Scand J Dent Res 88, 340-347 (1980)
- 8) Inoue T, Deporter D A and Melcher A H: Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. J Dent Res 65, 12-22 (1986)
- 9) Okamoto Y, Horisaka Y, Matsumoto N, Yoshimura Y, Kawada J, Yamashita K and Takagi T: Muscle tissue reactions to implantation of bone matrix gelatin. Clin Orthop 263, 242-253 (1991)
- 10) Yamashita K, Horisaka Y, Okamoto Y, Yoshimura Y, Matsumoto N, Kawada J and Takagi T: Effect of bupivacaine on muscle tissues and new bone formation

- induced by demineralized bone matrix gelatin. *Acta Anat* 144, 1-7 (1991)
- 11) Urist M R, Iwata H, Ceccotti P L, Dorfman R L, Boyd S D, McDowell R M and Chien C: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 3511-3515 (1973)
 - 12) Yamashita K, Horisaka Y, Satomura K and Takagi T: Analysis of minerals on initial calcification induced by bone matrix gelatin. *Jpn J Oral Biol* 33, 166-173 (1991)
 - 13) Yamashita K, Horisaka Y, Okamoto Y, Yoshimura Y, Matsumoto N, Kawada J and Takagi T: Architecture of implanted bone matrix gelatin influences heterotopic calcification and new bone formation. *Proc Soc Exp Biol Med* 197, 342-347 (1991)
 - 14) Yamashita K and Takagi T: Calcification preceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. *Arch Histol Cytol* 55, 31-43 (1992)
 - 15) Yamashita K and Takagi T: Ultrastructural observation of calcification preceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. *Acta Anat* 143, 261-267 (1992)
 - 16) Yamashita K and Takagi T: Ultrastructure of calcified muscle fibres at the implantation site of demineralized bone matrix gelatin. *Int J Exp Pathol* 74, 547-552 (1993)
 - 17) Yamashita K, Kuwahara M and Ishizuka H: Effect of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonic acid (EHDP) on new bone formation induced by bone matrix gelatin (BMG). *Acta histochem* 96, 181-195 (1994)
 - 18) 小澤英浩: “歯の形成と構造”. 骨の科学. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明著. 第1版. 東京, 医歯薬出版, 1985, 76-109
 - 19) Nimni M E, Bernick S, Cheung D T, Ertl D C, Nishimoto S K, Paule W J, Salka C and Strates B S: Biochemical

differences between dystrophic calcification of cross-linked collagen implants and mineralization during bone induction. *Calcif Tissue Int* 42, 313-320 (1988)

- 20) 佐野豊 : 組織学研究法 . 第6版 . 東京 , 南山堂 , 1985 , 318-319
- 21) 佐野豊 : 組織学研究法 . 第6版 . 東京 , 南山堂 , 1985 , 180-181
- 22) 佐野豊 : 組織学研究法 . 第6版 . 東京 , 南山堂 , 1985 , 617-618
- 23) 佐野豊 : 組織学研究法 . 第6版 . 東京 , 南山堂 , 1985 , 676
- 24) Cunningham N S, Paralkar V and Reddi A H: Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor β 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 11740-11744 (1992)
- 25) Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz L D and Nishikawa S: The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442-444 (1990)
- 26) Felix R, Cecchini M G and Fleisch H: Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the OP/OP osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 127, 2592-2594 (1990)
- 27) Takahashi N, Udagawa N, Akatsu T, Tanaka H, Isogai Y and Suda T: Deficiency of osteoclasts in osteopetrotic mice is due to a defect in the local microenvironment provided by osteoblastic cells. *Endocrinology* 128, 1792-1796 (1991)
- 28) Kodama H, Yamasaki A, Nose M, Niida S, Ohgame Y, Abe M, Kumegawa M and Suda T: Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (OP/OP) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 173, 269-272 (1991)
- 29) Kodama H, Yamasaki A, Abe M, Niida S, Hakeda Y and Kawashima H: Transient recruitment of osteoclasts and

- expression of their function in osteopetrotic (OP/OP) mice by a single injection of macrophage colony-stimulating factor. *J Bone Miner Res* 8, 45-50 (1993)
- 30) Ejiri S: The preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast: ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone. *Arch Histol Jap* 46, 533-557 (1983)
- 31) Irie K and Ozawa H: Relationships between tooth eruption, occlusion and alveolar bone resorption: cytological and cytochemical studies of bone resorption on rat incisor alveolar bone facing the enamel. *Arch Histol Cytol* 53, 497-509 (1990)
- 32) McSheehy P M and Chambers T J: Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 119, 1654-1659 (1986)
- 33) Firschein H E and Urist M R: Enzyme induction, accumulation of collagen, and calcification in implants of bone matrix. *Clin Orthop* 84, 263-275 (1972)
- 34) Linden G J: Bone induction in implants of decalcified bone and dentine. *J Anat* 119, 359-367 (1975)
- 35) Vukicevic S, Luyten F P and Reddi A H: Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8793-8797 (1989)
- 36) Vukicevic S, Luyten F P and Reddi A H: Osteogenin inhibits proliferation and stimulates differentiation in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Biochem Biophys Res Commun* 166, 750-756 (1990)
- 37) Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney J M, Rosen V, Wang E A, Tanaka H, Omura S and Suda T: The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by

- recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 295-299 (1990)
- 38) Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney J M, Rosen V, Wang E A, Kahn A J, Suda T and Yoshiki S: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* 113, 681-687 (1991)
- 39) Takuwa Y, Ohse C, Wang E A, Wozney J M and Yamashita K: Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem Biophys Res Commun* 174, 96-101 (1991)
- 40) Sampath T K, Maliakal J C, Hauschka P V, Jones W K, Sasak H, Tucker R F, White K H, Coughlin J E, Tucker M M, Pang R H, Corbett C, Özkaynak E, Oppermann H and Rueger D C: Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 267, 20352-20362 (1992)
- 41) Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney J M, Fujisawa S A and Suda T: Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127, 1755-1766 (1994)
- 42) 須田立雄: “骨と軟骨の有機成分”. 骨の科学. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明著. 第1版. 東京, 医歯薬出版, 1985, 110-119
- 43) Yamauchi M, London R E, Guenat C, Hashimoto F and Mechanic G L: Structure and formation of a stable histidine-based trifunctional cross-link in skin collagen. *J Biol Chem* 262, 11428-11434 (1987)

- 44) Mechanic G L, Katz E P, Henmi M, Noyes C and Yamauchi M: Locus of a histidine-based, stable trifunctional, helix to helix collagen cross-link: stereospecific collagen structure of type I skin fibrils. *Biochemistry* 26, 3500-3509 (1987)
- 45) Kuboki Y, Takagi T, Shimokawa H, Oguchi H, Sasaki S and Mechanic G L: Location of an intermolecular crosslink in bovine bone collagen. *Connect Tiss Res* 9, 107-114 (1981)
- 46) Banes A J, Yamauchi M and Mechanic G L: Nonmineralized and mineralized compartments of bone: the role of pyridinoline in nonmineralized collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 113, 975-981 (1983)
- 47) Otsubo K, Katz E P, Mechanic G L and Yamauchi M: Cross-linking connectivity in bone collagen fibrils: the COOH-terminal locus of free aldehyde. *Biochemistry* 31, 396-402 (1992)
- 48) Yamauchi M and Katz E P: The post-translational chemistry and molecular packing of mineralizing tendon collagens. *Connect Tissue Res* 29, 81-98 (1993)
- 49) Vardaxis N J, Ruijgrok J M, Rietveld D C, Marres E M and Boon M E: Chemical and physical properties of collagen implants influence their fate in vivo as evaluated by light and confocal microscopy. *J Biomed Mater Res* 28, 1013-1025 (1994)
- 50) Levy R J, Schoen F J, Sherman F S, Nichols J, Hawley M A and Lund S A: Calcification of subcutaneously implanted type I collagen sponges: effects of formaldehyde and glutaraldehyde pretreatments. *Am J Pathol* 122, 71-82 (1986)
- 51) Katsura N: Nanospace theory for biomineralization. *Dentistry in Japan* 27, 57-63 (1990)
- 52) Katsura N, Tanaka O and Yokoyama M: Three dimensional structure of type I collagen and mineralization.

Connect Tissue 22, 92-98 (1991)

53) 久保木芳徳：骨形成の基礎と臨床－硬組織再建の原理．

日本口蓋裂学会雑誌 16, 169-179 (1991)



图 1

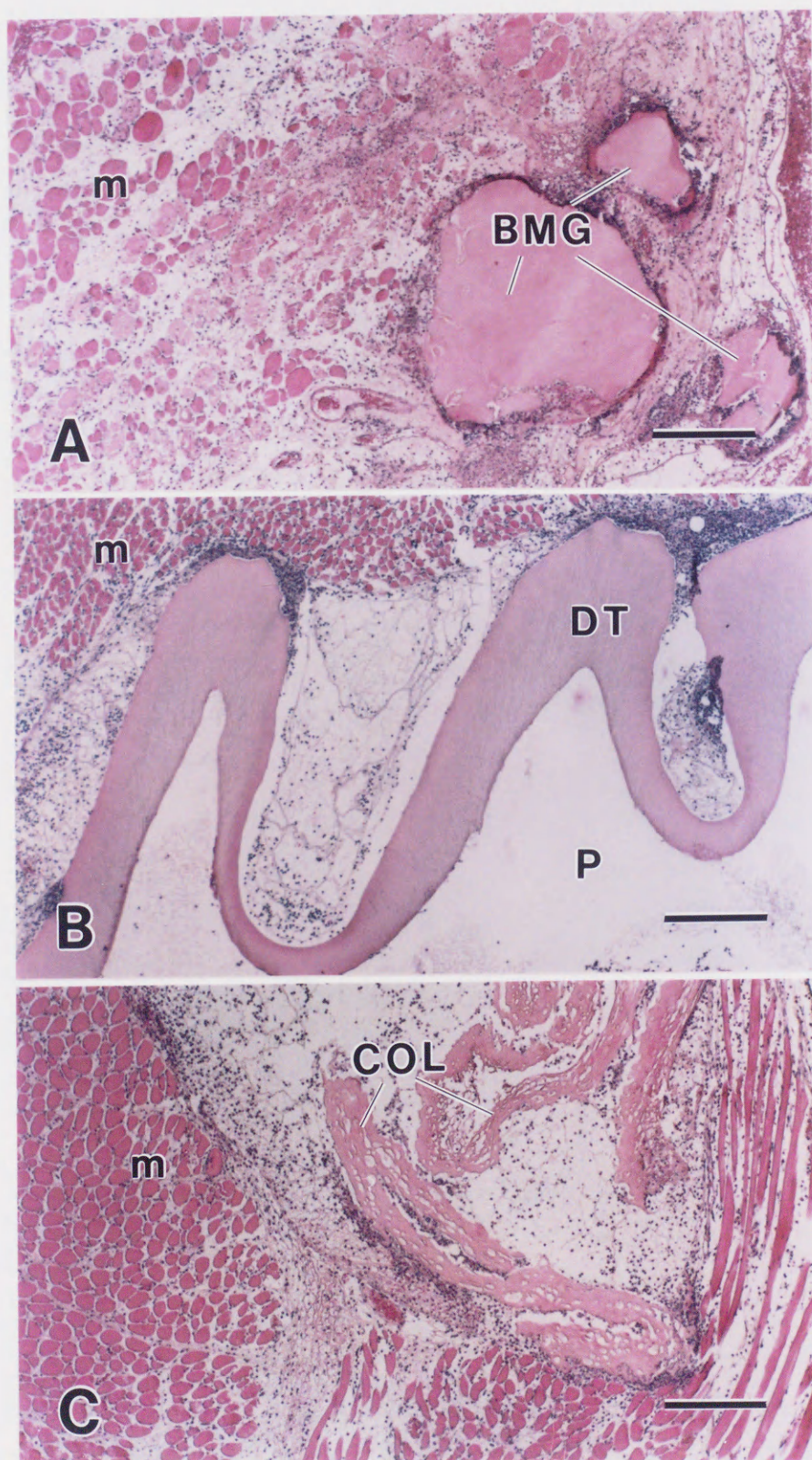
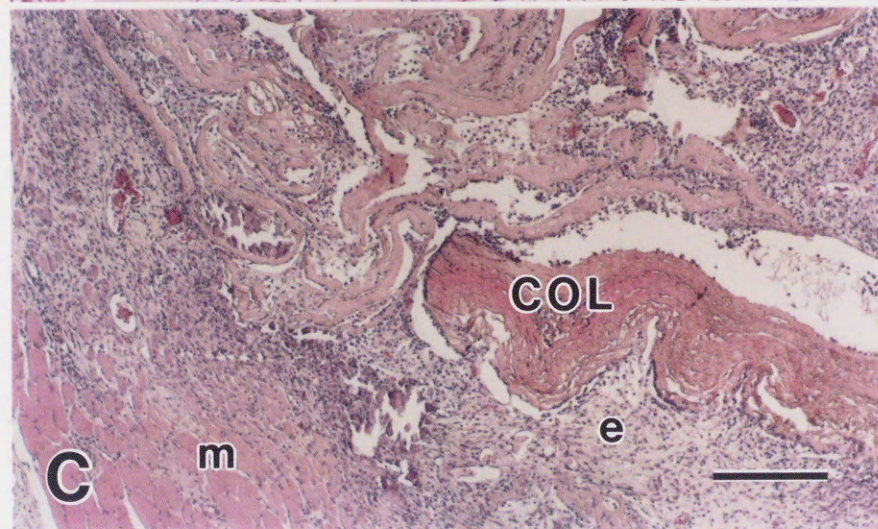
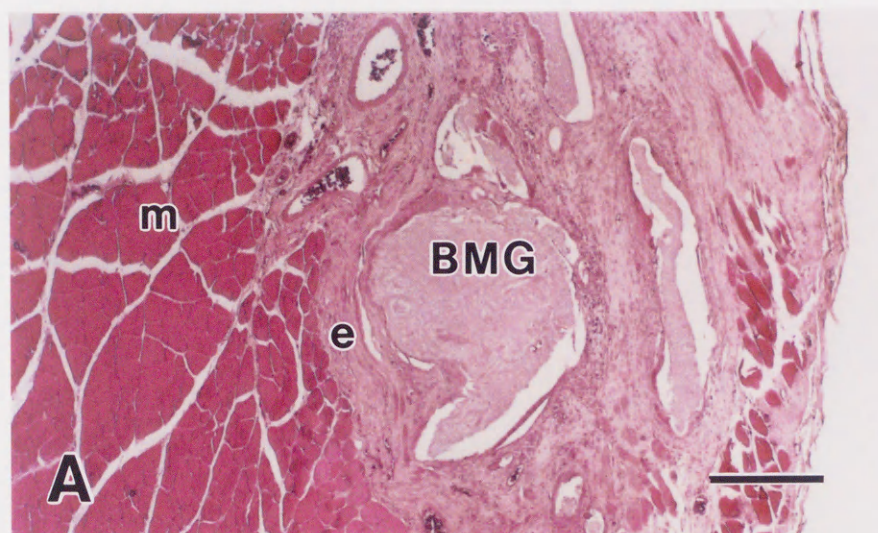
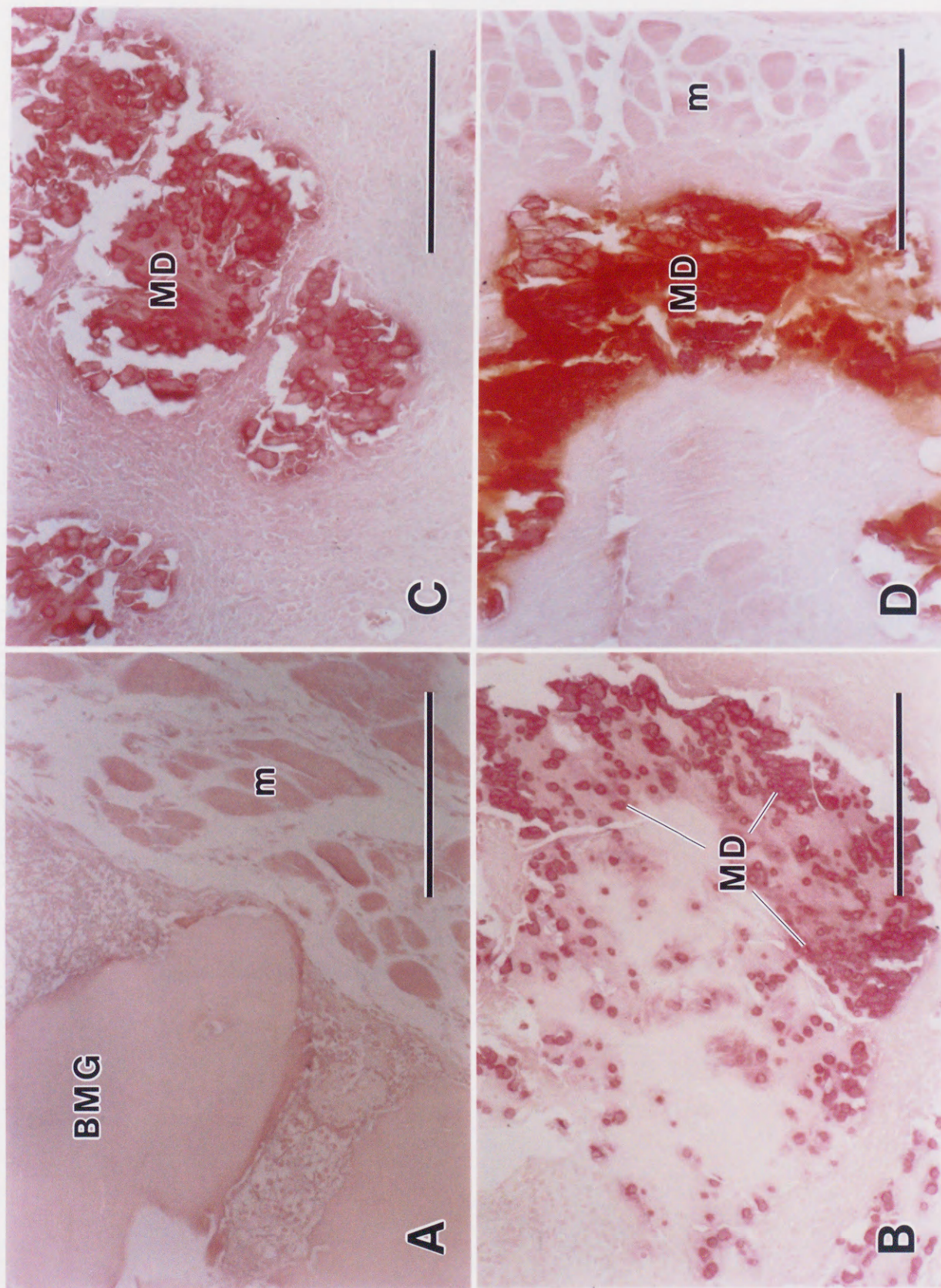
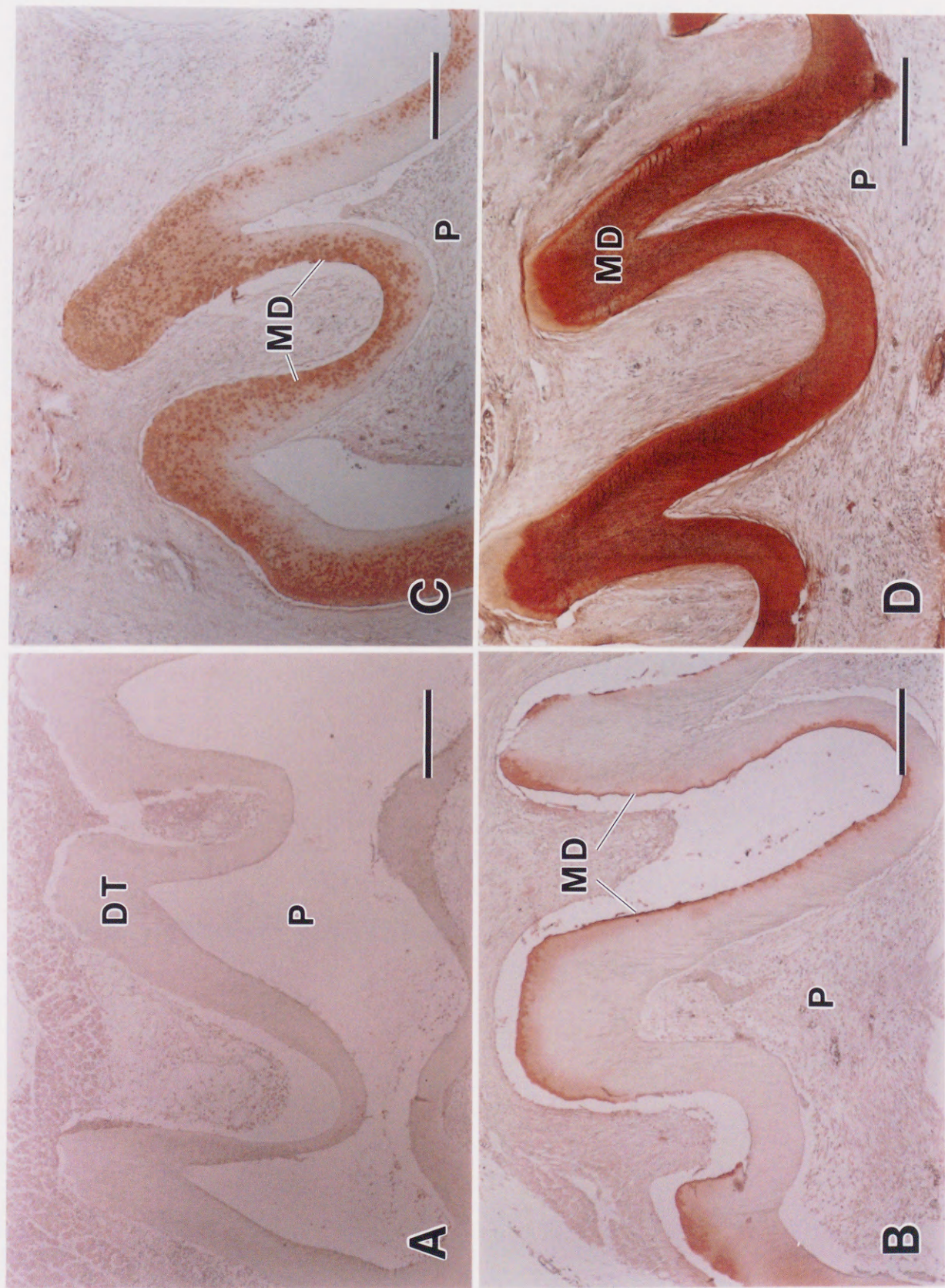
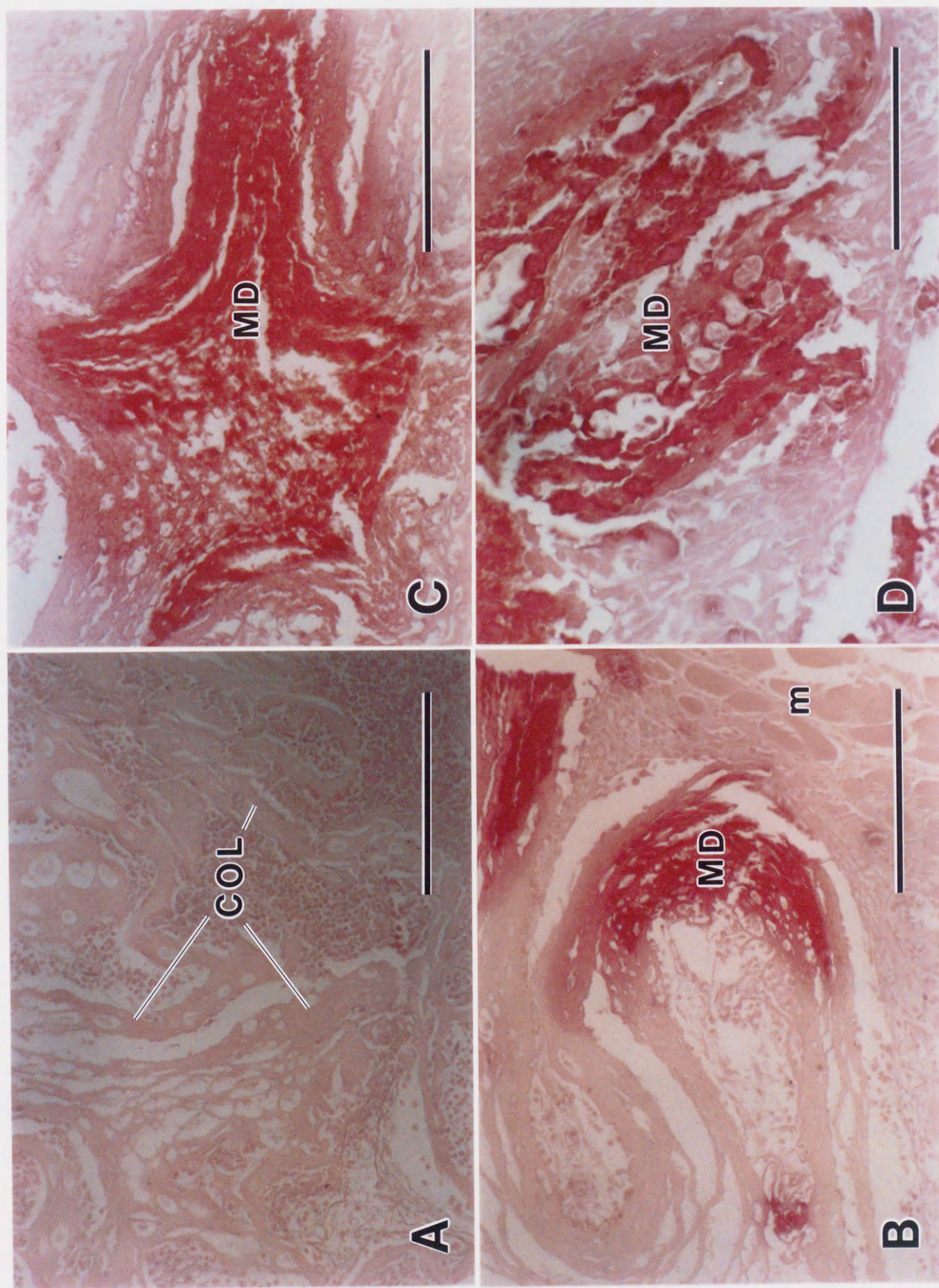


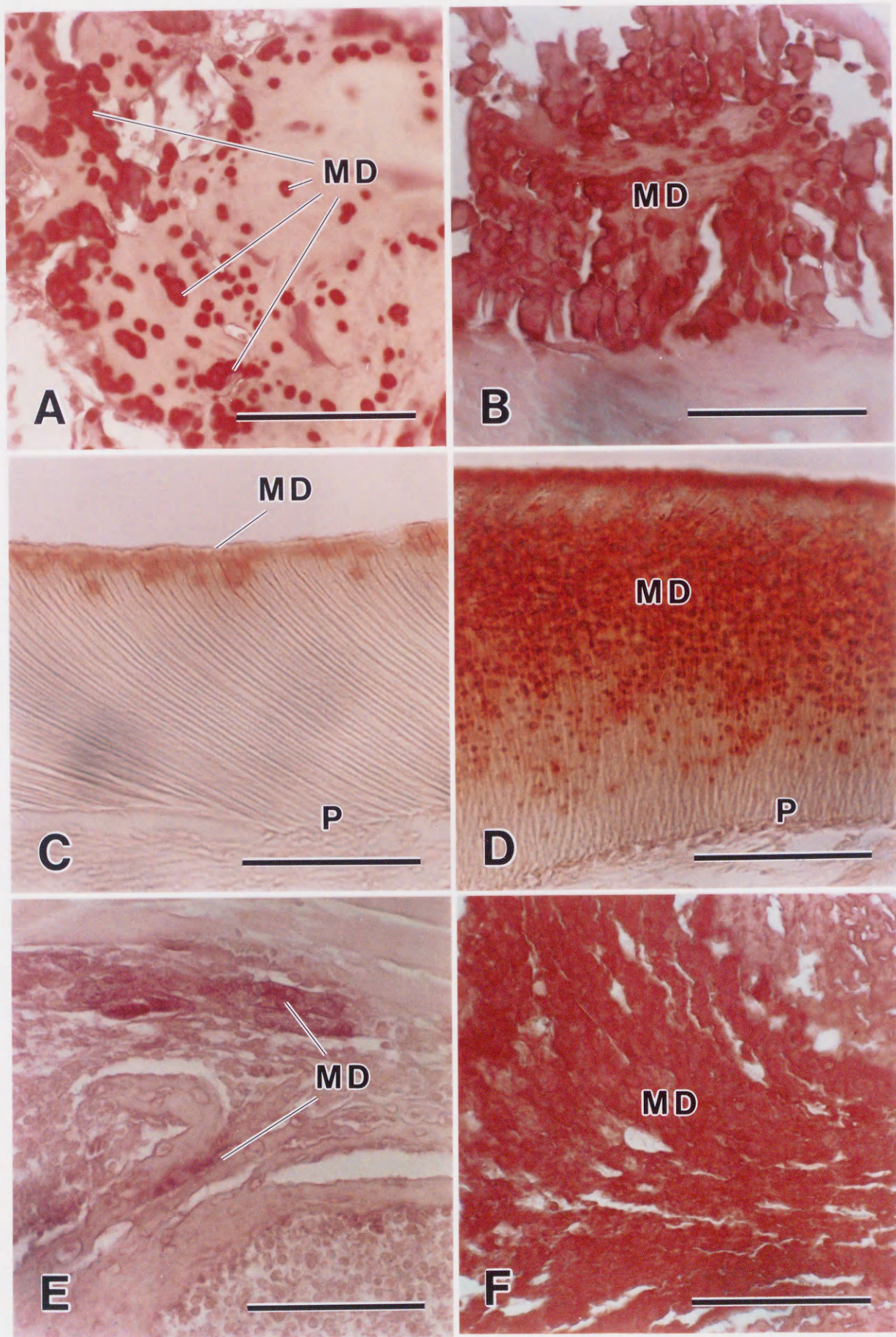
图 2

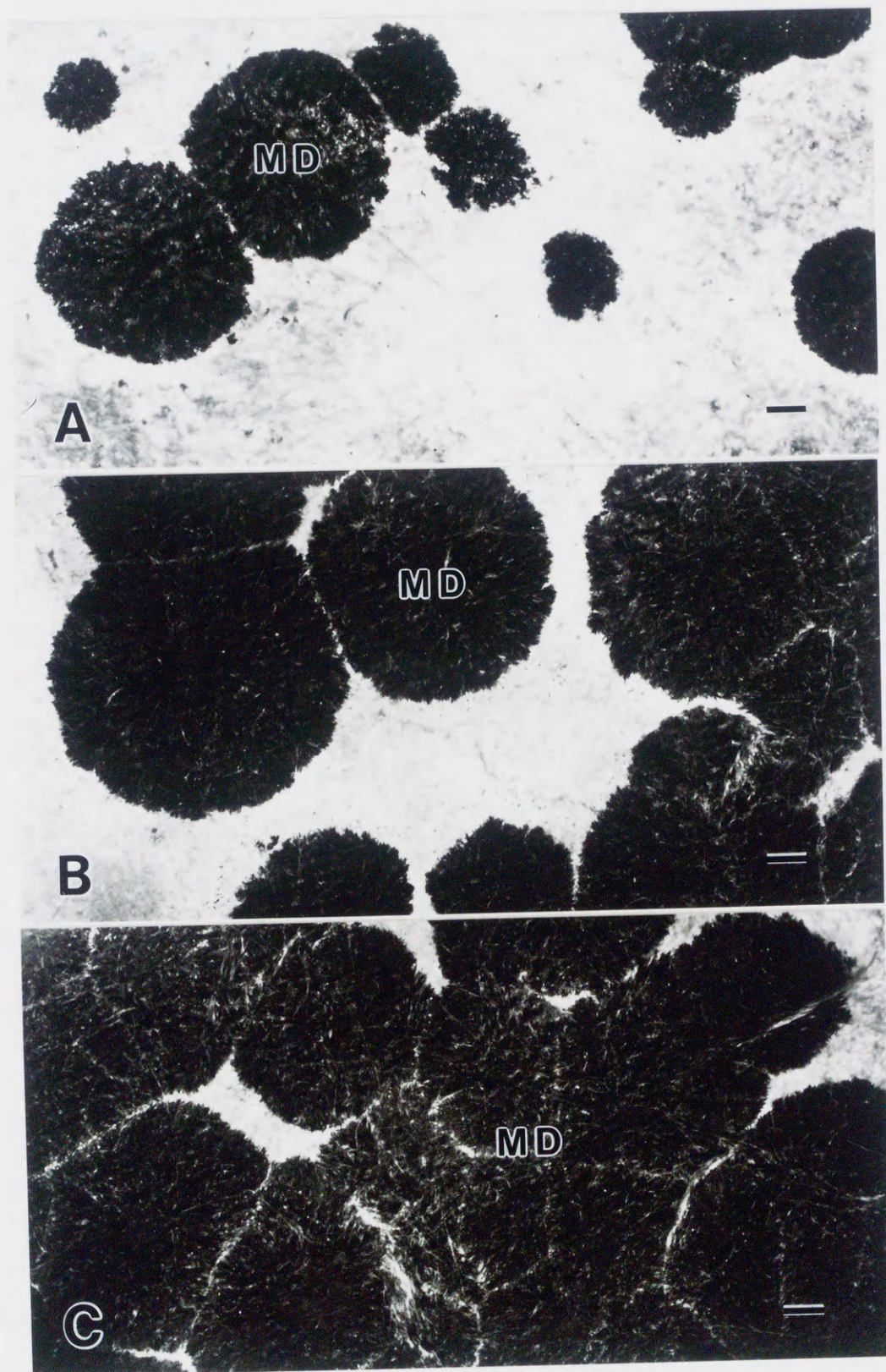












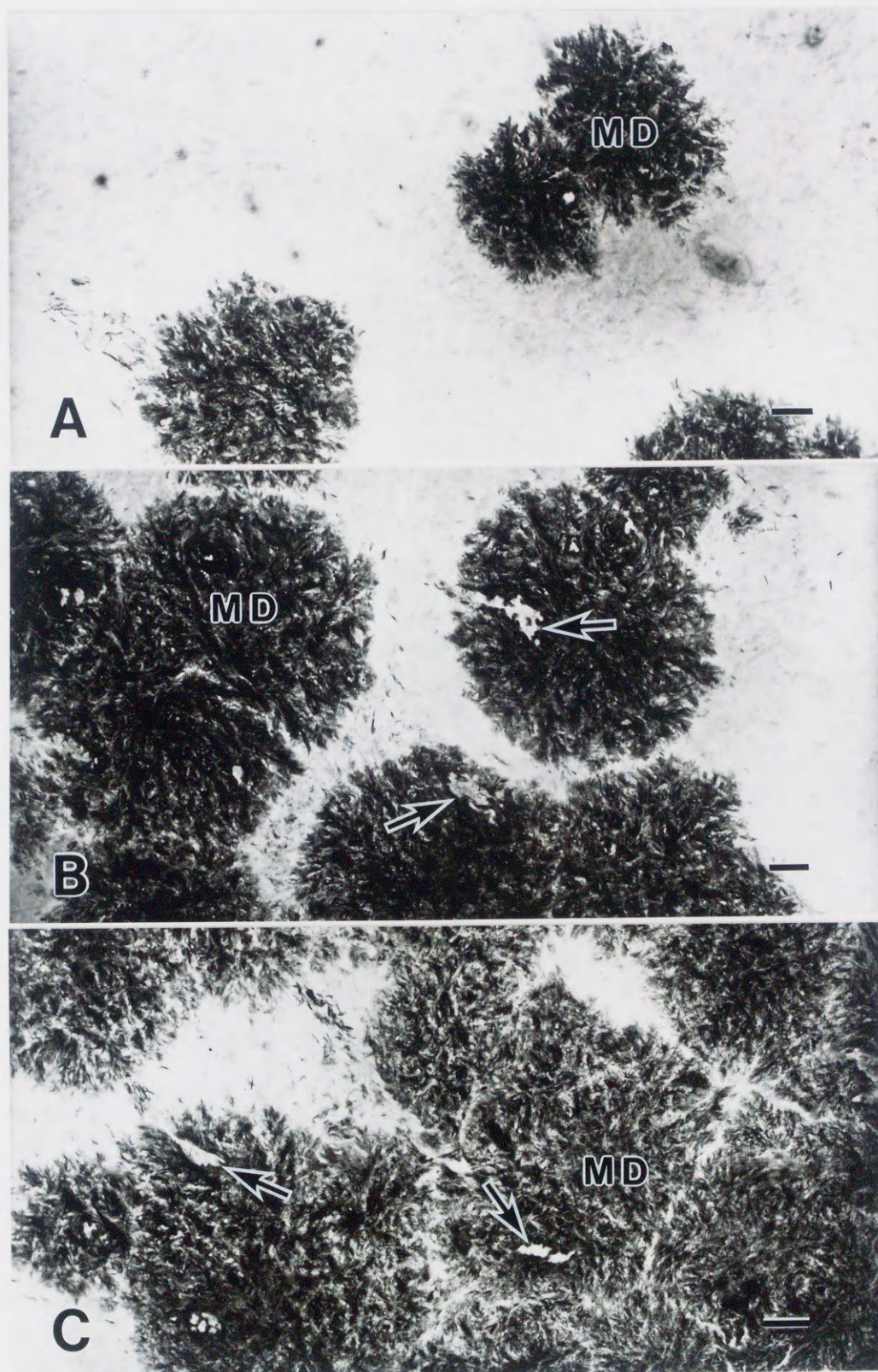


图 9

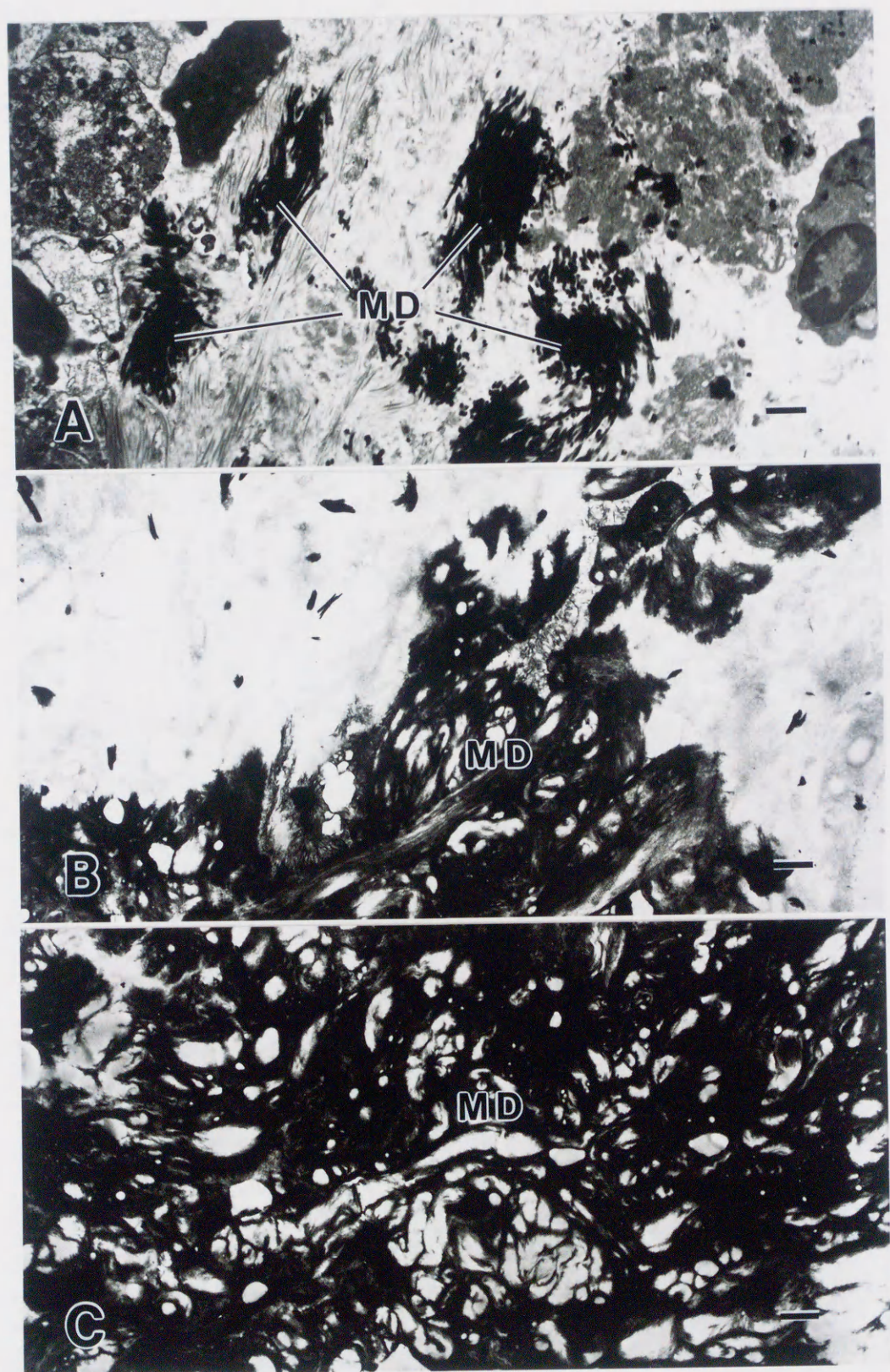


图 10

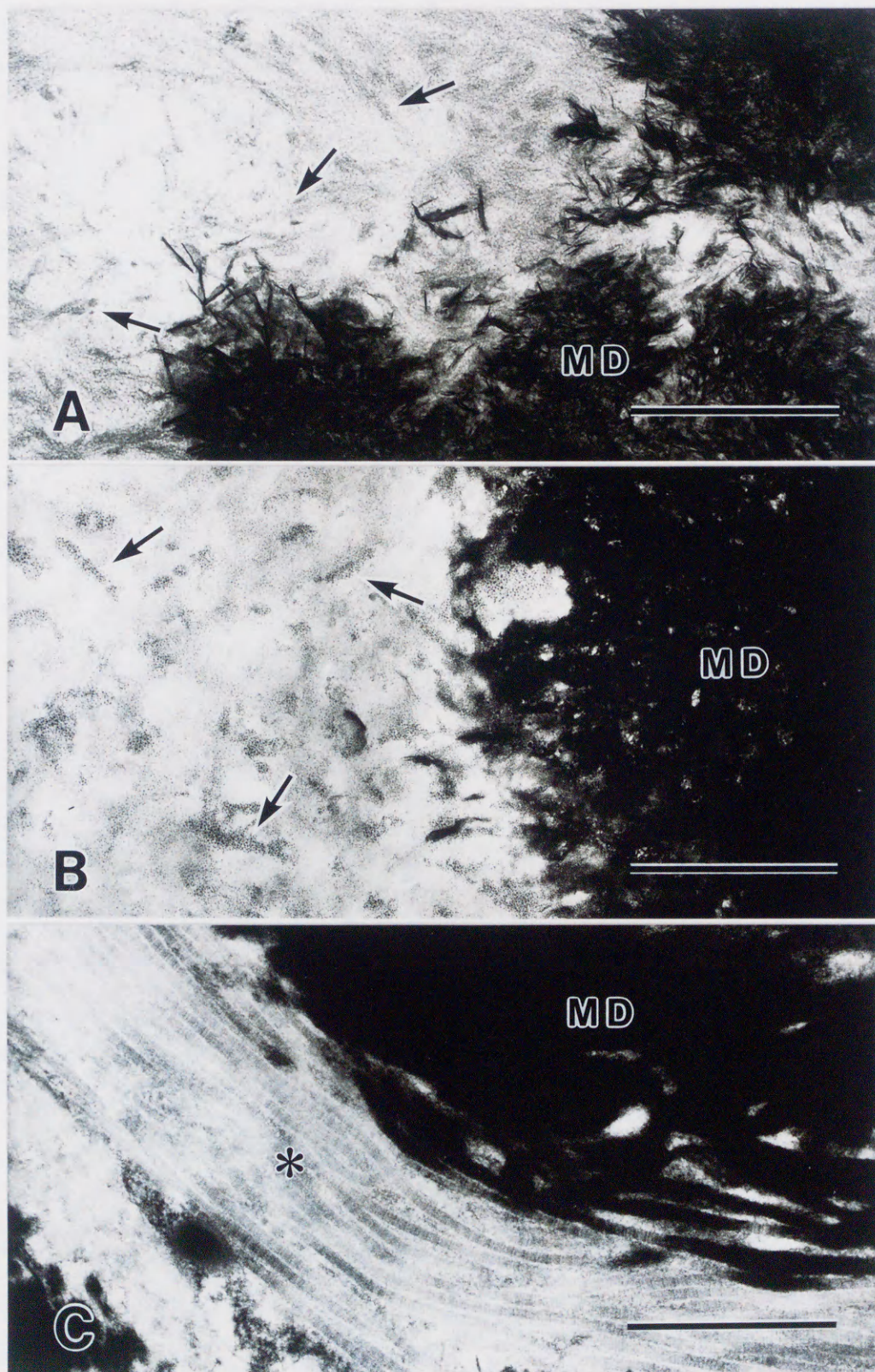
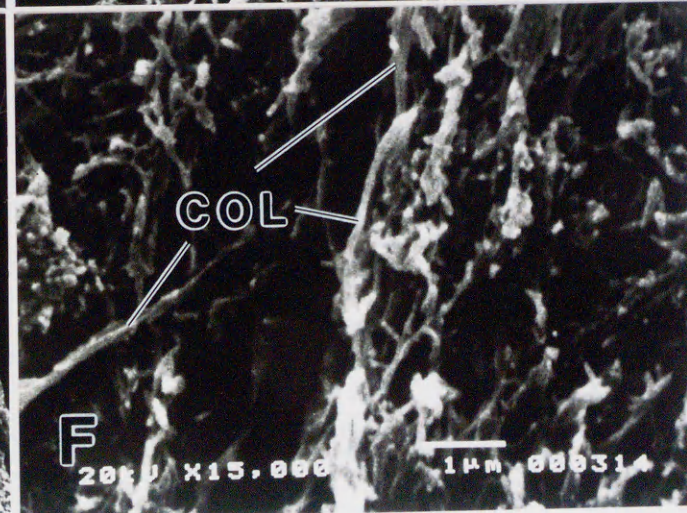
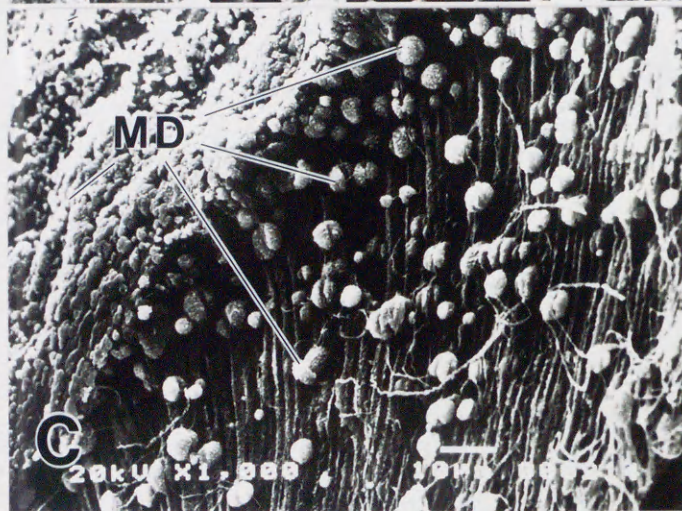
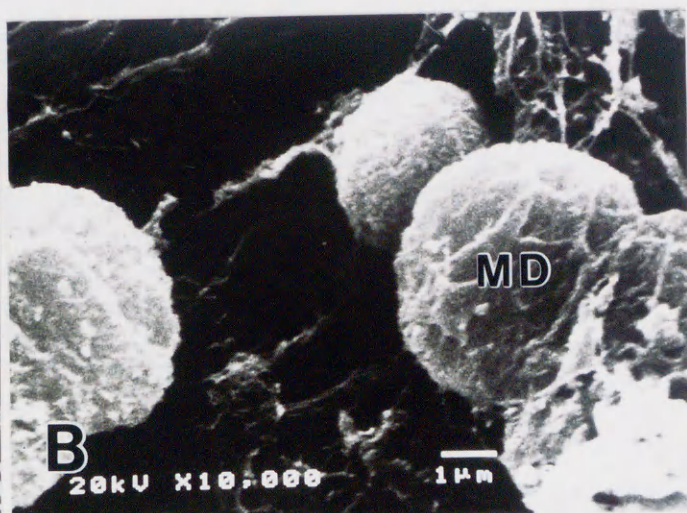
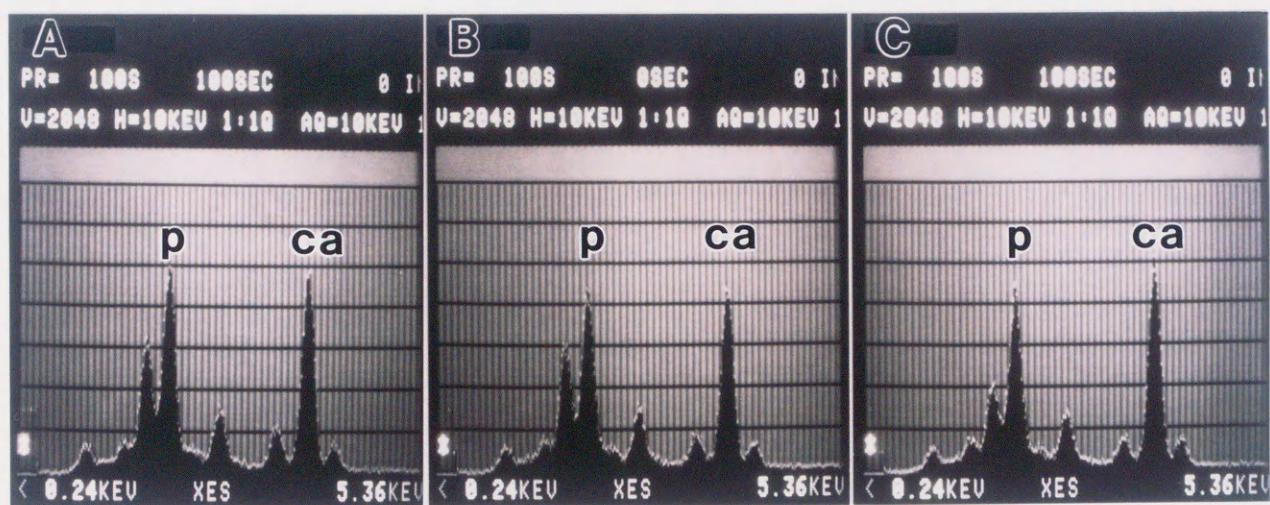
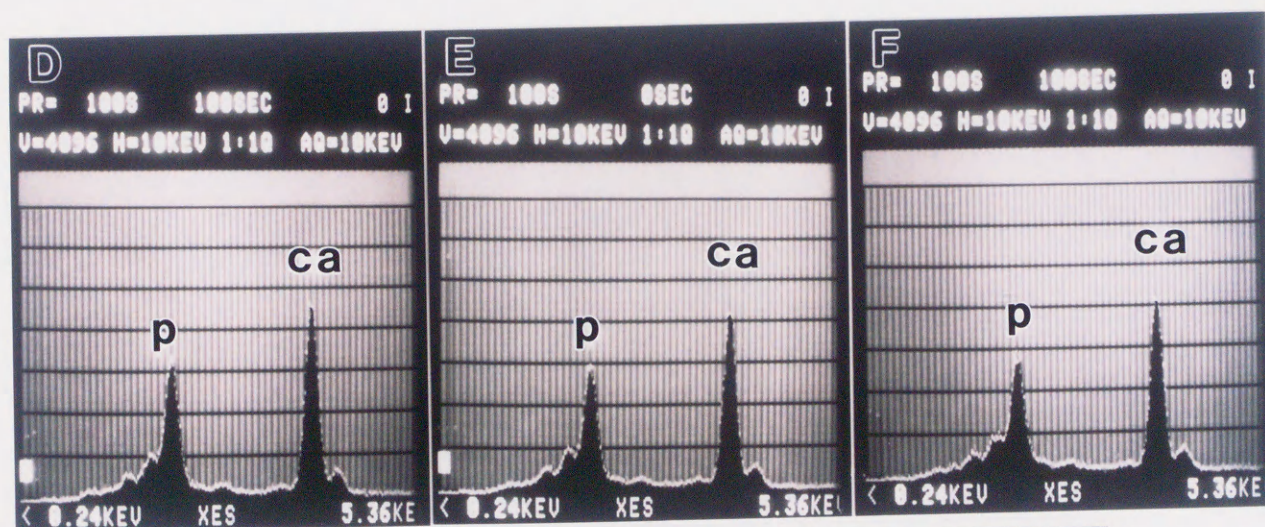


図 11





移植体 モル比	熱変性 BMG	熱変性脱灰歯	架橋コラ-ゲン
Ca / P	1.01 ± 0.07	1.03 ± 0.03	1.08 ± 0.05



移植体 モル比	熱変性 BMG	熱変性脱灰歯	架橋コラ-ゲン
Ca / P	1.35 ± 0.08	1.32 ± 0.03	1.30 ± 0.06

図の説明

図 1. 移植体と移植の方法

Aは左から熱変性 BMG、熱変性脱灰歯、および架橋コラーゲンを示す。これらを、Bのように、それぞれラットの左右両側の腹直筋内に移植した。

BMG : 熱変性 BMG DT : 熱変性脱灰歯

COL : 架橋コラーゲン

(bar = 1 cm)

図 2. 移植後 1日目の移植体と周辺の組織像

A : 熱変性 BMG B : 熱変性脱灰歯

C : 架橋コラーゲン

移植体の周辺にはフィブリン網と血球細胞の著明な浸潤が認められる。

BMG : 熱変性 BMG DT : 熱変性脱灰歯

COL : 架橋コラーゲン m : 筋組織

P : 歯髄側

(bar = 100 μ m, 非脱灰切片, HE染色)

図 3. 移植後 14日目の移植体と周辺の組織像

A : 熱変性 BMG B : 熱変性脱灰歯

C : 架橋コラーゲン

移植体の周辺には血球細胞の浸潤が一部残るものの結合組織が認められるようになり、さらにその外側には正常に復した筋組織が認められる。どの移植体においても移植体の周辺に軟骨組織や骨組織の形成はみられず、破骨細胞様多核巨細胞による移植体の吸収やこれらの細胞の出現も認められない。

BMG : 熱変性 BMG DT : 熱変性脱灰歯

COL : 架橋コラーゲン e : 結合組織

m : 筋組織 P : 歯髄側

(bar = 100 μ m , 脱灰切片 , HE染色)

図 4 . 熱変性 BMG移植後の石灰化の経時的変化

A : 移植後 1日目 B : 移植後 3日目

C : 移植後 7日目 D : 移植後 14日目

球状石灰化物が移植後 3日目より移植体内に出現し、BMG片の辺縁部から中央部に向かって経時的に数や大きさを増し、相互に融合しながら14日目には移植体全体が高度に石灰化する。

BMG : 熱変性 BMG m : 筋組織

MD : 石灰化部位

(bar = 100 μ m , 非脱灰切片 , アリザリンレッド

S染色)

図 5. 熱変性脱灰歯移植後の石灰化の経時的変化

A : 移植後 1日目 B : 移植後 3日目

C : 移植後 7日目 D : 移植後 14日目

移植後 3日目でエナメル質側の象牙質表層に一層の石灰化層があり、そのすぐ深層に球状の石灰化物が散在する部分も認められる。球状石灰化物はその後、歯髄側に向かって数を増し、14日目には移植体全体が高度に石灰化する。

DT : 熱変性脱灰歯 MD : 石灰化部位

P : 歯髄側

(bar = 100 μ m, 非脱灰切片, アリザリンレッド S 染色)

図 6. 架橋コラーゲン移植後の石灰化の経時的変化

A : 移植後 1日目 B : 移植後 3日目

C : 移植後 7日目 D : 移植後 14日目

コラーゲン線維束の形状に沿った石灰化物が移植後 3日目より移植体の辺縁部に出現し、コラーゲン線維束の長軸に沿い、また隣接するコラーゲン線維束へと石灰化域を拡張、14日目には移植体全体が高度に石灰化する。

COL : 架橋コラーゲン m : 筋組織

MD : 石灰化部位

(bar = 100 μ m, 非脱灰切片, アリザリンレッド

S 染色)

図 7. 各移植体での石灰化の比較

A : 熱変性 BMG, 移植後 3 日目

B : 熱変性 BMG, 移植後 7 日目

C : 熱変性脱灰歯, 移植後 3 日目

D : 熱変性脱灰歯, 移植後 7 日目

E : 架橋コラーゲン, 移植後 3 日目

F : 架橋コラーゲン, 移植後 7 日目

いずれの移植体も、移植後 3 日目より石灰化物
が出現し、7 日目以降には移植体の大部分を占
めるようになる。

MD : 石灰化部位 P : 歯髄側

(bar = 50 μ m, 非脱灰切片, アリザリンレッド

S 染色)

図 8. 熱変性 BMGでの石灰化物の透過型電子顕微鏡像

A : 移植後 3 日目 B : 移植後 5 日目

C : 移植後 7 日目

移植後 3 日目では、直径 1 ~ 5 μ m の球状石灰化
物が散在し、5 日目では、数と大きさを増し直
径 8 μ m のものも認められる。7 日目では、球状
石灰化物がさらに増加して相互に融合している
のが観察される。

MD : 石灰化部位

(bar = 1 μ m , 非脱灰切片)

図 9 . 熱変性脱灰歯での石灰化物の透過型電子顕微鏡像

A : 移植後 5 日目

B : 移植後 7 日目

C : 移植後 10 日目

象牙質のやや深層を示す。

移植後 5 日目では、直径 4 ~ 6 μ m のほぼ球状の石灰化物が散在し、7 日目では、数と大きさを増し、10 日目では、球状石灰化物がさらに増加して相互に融合しているのが観察される。球状石灰化物には電子透過性の低い部分 (矢印) が随所に島状に認められる。

MD : 石灰化部位

(bar = 1 μ m , 非脱灰切片)

図 10 . 架橋コラーゲンでの石灰化域の透過型電子顕微鏡像

A : 移植後 3 日目

B : 移植後 5 日目

C : 移植後 7 日目

移植後 3 日目では、細片線維様の石灰化物の集合する石灰化域が非石灰化コラーゲン線維間に散在し、経時的に石灰化域を拡大していくのが

観察される。

MD : 石灰化部位

(bar = 1 μ m, 非脱灰切片)

図 11. 移植後 7 日目の各移植体での石灰化物と周辺の微細構造

A : 熱変性 BMG B : 熱変性脱灰菌

C : 架橋コラーゲン

各移植体に生じた石灰化物は、いずれも微細な針状結晶の凝集体である。熱変性 BMG や熱変性脱灰菌では石灰化物周囲のコラーゲン線維に散開像 (矢印) が認められる。一方、架橋コラーゲンでは散開像は認められず、コラーゲン線維 (* 印) は D 周期が明瞭で、ほぼ一定の方向に走行している。

MD : 石灰化部位

(bar = 1 μ m, 非脱灰切片)

図 12. 各移植体での石灰化物の走査型電子顕微鏡像

A, B : 熱変性 BMG C, D : 熱変性脱灰菌

E, F : 架橋コラーゲン

各移植体の移植後 7 日目の石灰化域で A, C, E は弱拡大像、B, D, F は強拡大像を示す。

熱変性 BMG では、球状石灰化物が多数存在し、

相互に融合しているものも認められる。熱変性脱灰歯では、最表層の石灰化層は球状石灰化物が密集して形成されており、やや深部では少し歪んだ形の球状石灰化物が象牙細管の周囲をとりまくように形成されている。架橋コラーゲンでは、移植体全体は薄板状に集まったコラーゲン線維束が幾層にも重なる像を呈している。その薄板を強拡大にて観察すると、コラーゲン線維が束をなして網目状に配列しているが、石灰化している部位を明確に区別することはできない。

COL: コラーゲン線維 MD: 石灰化部位

(倍率は写真中に記載, 非脱灰切片)

図13. 各移植体での石灰化物のエレクトロンプローブ

X線微小分析

A, D: 熱変性 BMGの球状石灰化物

B, E: 熱変性脱灰歯の球状石灰化物

C, F: 架橋コラーゲンの石灰化域

各移植体の移植後7日目の透過型電子顕微鏡用超薄切片の石灰化部位において分析を行った。分析は10keV, 100秒間の条件下で各移植体の各部位において20回ずつ分析を行った。各図はその代表的なものであり、下の表は分析

20回のカルシウム／リンのモル比の平均±標準偏差を示す。

どの移植体の石灰化物も、近似したカルシウム／リンのモル比を示した。その値は各移植体の大部分で約1.0 (A, B, C)であったが、熱変性

BMGや熱変性脱灰歯の比較的大きな球状石灰化物の中心部や架橋コラーゲンの石灰化域の中心部 (D, E, F) ではモル比は約1.3であった。

Comparative Histological Study of Mineralizations after Intramuscular
Implantations of Heat-denatured Demineralized Bone Matrix Gelatin,
Heat-denatured Demineralized Tooth, and Cross-linked Collagen.

Masami NINOMIYA

Department of Periodontology and Endodontology, Tokushima University
School of Dentistry

Abstract: Intramuscular implantation of demineralized bone matrix gelatin (BMG) is known to form spherical mineralized deposits in the implant prior to bone tissue formation induced by bone morphogenetic protein (BMP). This type of mineralization is called "acellular mineral deposition (AMD)", which is not associated with osteogenic cells. In the present study, heat-denatured BMG, heat-denatured demineralized tooth, and calf skin type I collagen cross-linked with glutaraldehyde were respectively implanted into the rectus abdominis muscles in rats. Then mineralized deposits formed in the implants after the respective implantations were compared by means of histological analysis using light and electron microscopes. Compositions of these deposits were also analyzed with electron probe x-ray microanalysis. Heat-denatured BMG, which was prepared at 150°C for 30 minutes 2 times to inactivate non-collagenous proteins including BMP(NCP), was used to investigate whether or not NCP had some roles in AMD process. Heat-denatured demineralized tooth and cross-linked collagen were also used to examine the relations of AMD with calcification of dentin and with matrix collagen.

The results can be summarized as follows.

- 1) In heat-denatured BMG, spherical mineralized deposits firstly appeared at day 3 and then gradually increased in the size and the number.

Finally these deposits fused with each other to occupy the whole implant at day 14.

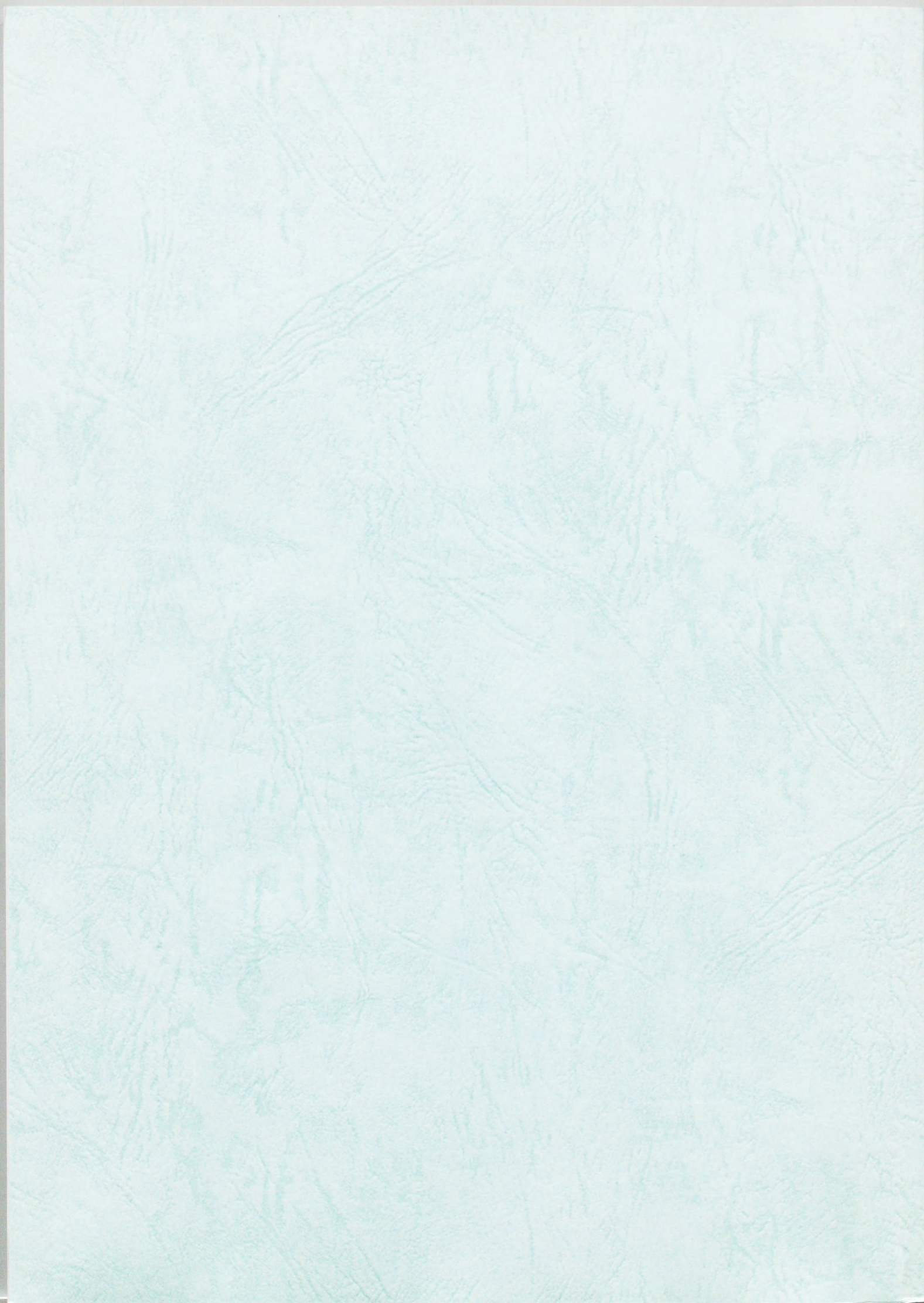
2) Similar observations were obtained in the case of heat-denatured demineralized tooth implant. Mineralization was progressed in one way from enamel side to dental pulp side. Predentin area did not easily mineralized during the experimental period.

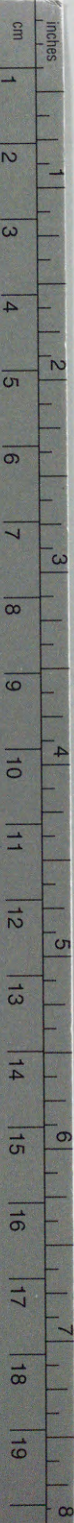
3) In cross-linked collagen, fiber-like mineralized deposits were scattered along collagen fiber bundles at day 3. These deposits gradually increased in the number and invaded into the surrounding collagen fibers to increase in the size, and then these deposits fused with each other to occupy the whole implant at day 14.

4) Bone and cartilaginous tissues did not appear around the implants, and also there were no osteoblast- and osteoclast- like cells in any implants.

5) Mineralized deposits were formed compactly showing needle-shaped crystals in all implants. Composition analysis revealed that these deposits showed a similar molecular ratio of calcium to phosphorus.

Taken together, it has been clarified that AMD occurs with no relation to the subsequent bone tissue formation and that NCP never have any roles in AMD process. Moreover, it is also suggested that AMD physicochemically occurs depending on cross-linked collagen of matrix and that AMD observed in the implanted dentin may take place in the physiological mineralization because of the morphological similarity between AMD and globular dentin.

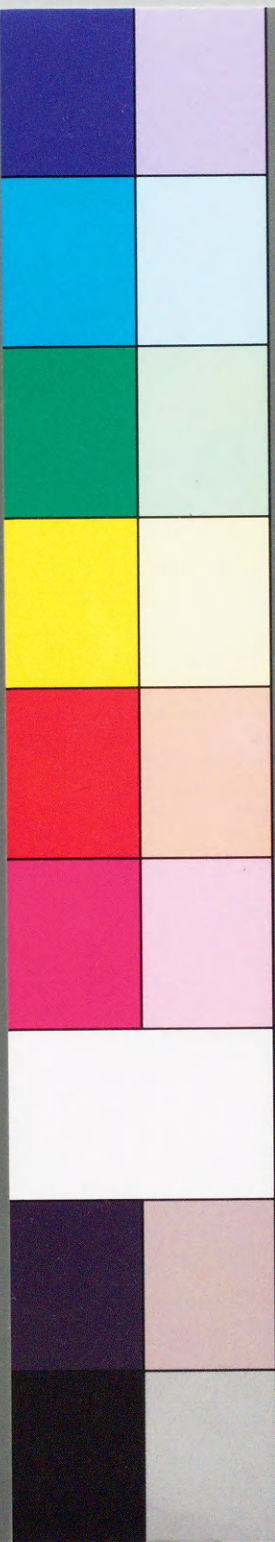




Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

